

OATP1B3-GENEETTISTEN VARIANTTIEN
TOIMINNAN TUTKIMINEN OPTIMOIDULLA *IN VITRO*-MENETELMÄLLÄ

Pauliina Suotunen
Helsingin Yliopisto
Farmasian tiedekunta
Biofarmasian osasto

Maaliskuu 2020



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty		Osasto/Sektion– Department
Farmasian tiedekunta		Farmaseuttisten biotieteiden osasto
Tekijä/Författare – Author		
Pauliina Suotunen		
Työn nimi / Arbetets titel – Title		
OATP1B3-geneettisten varianttien toiminnan tutkiminen optimoidulla <i>in vitro</i> -menetelmällä		
Oppiaine /Läroämne – Subject		
Biofarmasia		
Työn laji/Arbetets art – Level	Aika/Datum – Month and year	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages
Pro gradu	Maaliskuu 2020	65
Tiivistelmä/Referat – Abstract		
<p>OATP1B3-kuljetinproteiini kuuluu orgaanisten anionien kuljetinproteiineihin (OATP), joita koodaavat <i>SLC</i>-geeniperheeseen kuuluvat <i>SLCO</i>-geenit. Se on pääasiallisesti maksan hepatosyyttien basolateraalikalvolla ekspressoituva influksi-kuljetinproteiini, joka kuljettaa monia endogeenisiä substraatteja sekä kliinisesti tärkeitä lääkkeitä kuten kilpirauhashormoneja ja statiineja hepatosyytteihin ja osallistuu siten maksametabolian ensimmäiseen vaiheeseen. <i>SLCO1B3</i>-geenistä löydetty pistemutaatio voi vaikuttaa sen substraattien farmakokinetiikkaan ja farmakodynamiikkaan. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli pysäyttää ja optimoida <i>in vitro</i>-menetelmä, jonka avulla voidaan tutkia OATP1B3-kuljetinproteiinia ja sen geneettisten varianttien toimintaa ja ekspressiota.</p> <p>Pistemutaatio 334T>G (Ser112Ala), 699G>A (Met233Ile) ja 767G>C (Gly256Ala) sekä lopetuskodoni TAA lisättiin <i>SLCO1B3</i>-geeniin kohdennettua mutageneesia hyödyntäen. Rekombinantti bakulovirusvektoreita, jotka sisälsivät OATP1B3-kuljetinproteiinin ja sen varianttien geneettisen informaation, käytettiin ohimenevästi transfektoimaan HEK293-solut. Kun substraatin inkubaatioaika ja pitoisuus sekä virusmäärä oli optimoitu sekä fluoresoiva substraatti (8-FcA) valittu, soluunottokokeella määritettiin OATP1B3-varianttien kuljetusaktiivisuus HEK293-soluissa. Työssä määritettiin myös keinotekoisien WTP-varianttien kuljetusaktiivisuus.</p> <p>Ser112Ala-, Met233Ile- ja Gly256Ala-varianttien kuljetusaktiivisuudet eivät eronneet tilastollisesti merkittävästi villityypistä, vaikka Met233Ile-variantin kuljetusaktiivisuus vaikuttaa hieman heikentyneen. WTP-variantti oli puolestaan kykenemätön kuljettamaan 8-FcA:ta.</p> <p>Tämän tutkimuksen perusteella OATP1B3-varianttien toimintaa voidaan tutkia käyttäen ohimenevästi rekombinantti bakulovirusilla transfektoituja HEK293-soluja. 8-FcA:ta voidaan käyttää mallisubstraattina näissä tutkimuksissa. Tutkimuksen tulokset vahvistavat aiempaa tutkimustietoa Ser112Ala-, Met233Ile- ja Gly256Ala -varianttien toiminnasta. Lisää tutkimusta tarvitaan näiden varianttien vaikutuksista OATP1B3-lääkeainesubstraattien kuljetukseen. Myös tutkimusta WTP-variantin sijainnista solussa, solukalvo- ja kokonaisekspressiosta tarvitaan, jotta voidaan luotettavasti arvioida sen toimimattomuuden syitä.</p>		
Avainsanat – Nyckelord – Keywords		
Aminohappomuutos, esiintymistiheys, farmakogenetiikka, kuljetinproteiini, OATP1B3, pistemutaatio, proteiiniekspressio, <i>SLCO1B3</i>		
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited		
ethesis.helsinki.fi		
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information		
Ohjaajat: Heidi Kidron, Wilma Kiander		



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Faculty of Pharmacy		Osasto/Sektion– Department Division of Pharmaceutical Biosciences	
Tekijä/Författare – Author Pauliina Suotunen			
Työn nimi / Arbetets titel – Title Investigation of the function of OATP1B3 genetic variants by optimized <i>in vitro</i> method			
Oppiaine /Läroämne – Subject Biopharmacy			
Työn laji/Arbetets art – Level Master's thesis		Aika/Datum – Month and year March 2020	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 65
Tiivistelmä/Referat – Abstract <p>The OATP1B3 belongs to the organic anion transporting polypeptides (OATPs) encoded by the <i>SLCO</i> (solute carrier organic anion) genes which belongs to the <i>SLC</i> (solute carriers) gene superfamily. It is an influx transporter which is primarily expressed on the basolateral membrane of the hepatocytes. It transports many endogenous substrates as well as clinically important drugs such as thyroid hormones and statins into hepatocytes and thus participates in the first step of hepatic metabolism. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the <i>SLCO1B3</i> gene can affect the pharmacokinetics and pharmacodynamics of its substrates. The aim of this study was to set up and optimize an <i>in vitro</i> method to study the function and expression of the OATP1B3 transporter and its genetic variants.</p> <p>SNPs 334T> G (Ser112Ala), 699G> A (Met233Ile) and 767G> C (Gly256Ala) and stop codon TAA were introduced into the <i>SLCO1B3</i> gene by site-directed mutagenesis. Recombinant baculovirus vectors containing the genetic information of OATP1B3 and its variants were used to transiently transfect the HEK293 cells. After optimizing the substrate incubation time and concentration, as well as the viral load and selecting the fluorescent substrate (8-FcA), the uptake assay was used to determine the transport activity of the OATP1B3 variants in HEK293 cells. The transport activity of the artificial WTP variant was also investigated in this study.</p> <p>The transport activities of the Ser112Ala, Met233Ile and Gly256Ala variants did not change significantly from the wild type although the transport activity of the Met233Ile variant appears to be slightly impaired. In turn the WTP variant was unable to transport 8-FcA.</p> <p>Based on this study the function of OATP1B3 variants can be studied using recombinant baculovirus to transiently transfect the HEK293 cells. 8-FcA can be used as a probe substrate in these studies. The results of this study confirm previous knowledge of the functioning of Ser112Ala, Met233Ile and Gly256Ala variants. More studies are needed about the effects of these variants on the transport of OATP1B3 drug substrates. Also studies about the location, cell membrane and total cell expression of the WTP variant are needed to evaluate reliably the reasons of its inactivity.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Amino acid change, frequency, pharmacogenetics, transporter, OATP1B3, single nucleotide polymorphism, protein expression, <i>SLCO1B3</i>			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited ethesis.helsinki.fi			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Supervisors: Heidi Kidron, Wilma Kiander			

SISÄLLYSLUETTELO

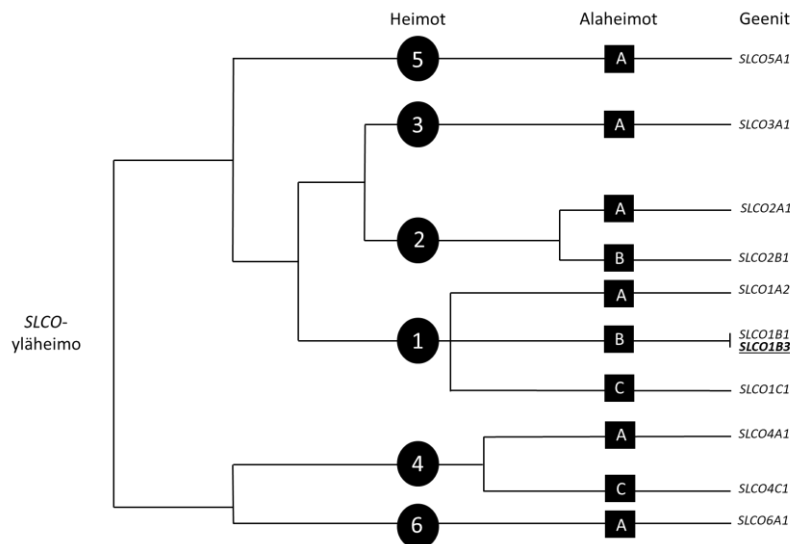
1	JOHDANTO	1
2	OATP1B3-KULJETINPROTEIINI.....	3
2.1	Transkription säätely ja post-translationalinen muokkaus	3
2.2	Rakenne ja jakautuminen	5
2.3	Syöpäspesifinen OATP1B3-variantti.....	9
2.4	Toiminta ja kuljetusmekanismi	11
2.5	Substraatit.....	12
2.6	HMG-CoA-reduktaasin estäjien farmakokineettisiä lääke-lääkeinteraktioita .	16
3	<i>SLCO1B3</i> -GEENIN FARMAKOGENETIIKKAA	19
3.1	Ei-synonyymisiä pistemutaatioita	19
3.1.1	Määritelmä	19
3.1.2	Aminohappojen kemialliset ominaisuudet aminohappomuutoksissa.....	19
3.1.3	Aminohappomuutoksen sijainnin merkitys	20
3.1.4	Esiintyvyys ja vaikutukset proteiiniekspressioon sekä kuljetus- aktiivisuuteen	22
3.2	Kopiolukumuutos.....	25
3.3	Rotorin syndrooma.....	26
4	TUTKIMUKSEN TAUSTA JA TAVOITTEET	29
5	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	30
5.1	Materiaalit	30
5.2	Kohdennettu mutageneesi	31
5.3	Soluviljely	32
5.4	Bac-to-bac bakulovirusekspressiomenetelmä	32
5.5	Kuljetusaktiivisuuden määrittäminen.....	35
5.6	Biotinylaatio ja Western blot	37
5.7	Datan käsittely.....	39
6	TULOKSET	40
6.1	TAA-lopetuskodonin lisääminen OATP1B3-kuljetinproteiiniin	40
6.2	OATP1B3-kuljetusaktiivisuuskokeen optimointi	40
6.3	Pistemutaatioiden 334T>G, 699G>A ja 767G>C sekä keinotekoisien <i>WTP</i> - geenin vaikutus OATP1B3-kuljetinproteiinin kuljetusaktiivisuuteen	43
6.4	OATP1B3-kuljetinproteiinin ekspressio HEK293-soluissa.....	44
7	POHDINTA	45
7.1	OATP1B3-kuljetinproteiinin tuottaminen	45
7.2	OATP1B3-kuljetusaktiivisuuskokeen optimointi	47
7.3	OATP1B3-varianttien kuljetusaktiivisuus	49
7.4	OATP1B3-kuljetinproteiinin proteiiniekspression määrittämisen haasteet.....	52
8	JOHTOPÄÄTÖKSET	54
	KIRJALLISUUSLUETTELO	55

LIITTEET

LIITE 1. *WTP*-variantin arvioitu aminohapposekvenssi

1 JOHDANTO

Orgaanisten anionien kuljetinproteiinit (organic anion transporting polypeptide, OATP) kuuluvat *SLC* (solute carriers) -geeniperheen *SLCO* (solute carrier organic anion) -yläheimoon (Murray ja Zhou 2017). Lisäksi *SLCO*-yläheimo jakautuu kuuteen heimoon (*SLCO1-SLCO6*) ja 13 alaheimoon, joista kymmenessä on ihmisillä esiintyviä geenejä 11 (Hagenbuch ja Stieger 2013). Kuvassa 1 on esitetty ihmisgeeneissä esiintyvien *SLCO*-yläheimoon kuuluvien geenien luokittelu ja nimeäminen. Samaa nimeämistä käytetään myös geeneistä koodattavien OATP-proteiinien luokittelussa. Samaan heimoon kuuluvat proteiinit ovat yli 40 %:sti identtisiä ja samaan alaheimoon kuuluvat ovat yli 60 %:sti identtisiä aminohappokoostumukseltaan (Hagenbuch ja Meier 2004).



Kuva 2. *SLCO*-yläheimoon kuuluvien ihmisen geenien luokittelu ja nimeäminen. Kuva muokattu Hagenbuchin ja Stiegerin (2013) artikkelista.

OATP-kuljetinproteiineja on havaittu kaikkien elimien endoteeli- tai epiteelisoluissa, vaikka osa niistä esiintyy vain tietyissä elimissä kuten OATP1B1- ja OATP1B3-kuljetinproteiinit, joita ilmenee pääosin maksassa (Hagenbuch ja Stieger 2013). OATP-proteiinit ovat influksi-proteiineja, joiden tehtävänä on kuljettaa pääasiassa endogeenisiä ja/tai ksenobioottisia amfipaattisia orgaanisia anioneja solun sisään. Kuljetusmekanismin on osoitettu olevan natriumista riippumatonta, mutta tarkkaa tietoa siitä ei ole (Kullak-

Ublick ym. 1995; Hagenbuch ja Stieger 2013). OATP-proteiineilla onkin olennainen rooli lääkeaineiden farmakokinetiikassa yhdessä solusta ulos aineita kuljettavien effluksi-kuljetinproteiinien ja metaboloivien entsyymien kanssa (Zhou ym. 2017).

Farmakogeneettiset tutkimukset SLC-geeniperheen geenien polymorfoiden vaikutuksista kuljetinproteiinien toimintaan ovat viime vuosina saaneet huomioita, sillä joidenkin polymorfoiden on osoitettu muuttavan lääkeaineiden tavanomaista farmakokinetiikkaa *in vitro* (Schwarz ym. 2011; Yee ym. 2018). Assosiaatiotutkimuksia polymorfoiden vaikutuksista kliinisiin lääkevasteisiin, lääkeainealtistuksiin ja haittavaikutuksiin on myös tehty ja muun muassa *SLCO1B1* 521T>C-pistemutaation aiheuttama simvastatiini-altistuksen nousu on liitetty myopatariskin kohoamiseen mutaation omaavilla henkilöillä (Pasanen ym. 2006; Link ym. 2008). ITC (The International Transporter Consortium) ja Euroopan lääkevirasto (EMA, European Medicines Agency) ohjeistavat tutkimaan kulkeutuuko uusi lääkemolekyyli OATP1B1- ja OATP1B3-välitteisesti *in vitro*, jos lääkemolekyylin maksametabolian tai sapen kautta erittymisen osuus on $\geq 25\%$ kokonaispuhdistumasta ja lääkeaineella on alhainen passiivinen permeabiliteetti (Giacomini ym. 2010; EMA 2012). Lisäksi erityisesti *SLCO1B1* 521T>C, *SLCO1B3* 334T>G ja 699G>A sekä *SLCO2B1* 935G>A polymorfoiden *in vitro* ja *in vivo* vaikutusten tutkimisen tärkeyttä on korostettu lääkekehityksen aikana (Yee ym. 2018). Eräiden *SLCO1B1*- ja *SLCO1B3*-geeneissä samanaikaisesti ilmenevien mutaatioiden on myös indikoitu aiheuttavan perinnöllistä Rotorin syndroomaa (van de Steeg ym. 2012).

Tässä työssä perehdytään tarkemmin *SLCO*-yläheimoon (OATP), *SLCO1*-heimoon (OATP1) ja *SLCO1B*-alaheimoon (OATP1B) kuuluvaan *SLCO1B3*-geeniin ja siitä koodattavaan OATP1B3 (OATP8, LST-2) -kuljetinproteiinin rakenteeseen, sijaintiin, toimintaan, substraatteihin sekä interaktioihin. Lisäksi selvitetään, mitä tiedetään OATP1B3-kuljetinproteiinin geneettisistä varianteista sekä niiden vaikutuksista proteiiniin toimintaan ja sijaintiin soluissa. Kokeellisessa työssä optimoidaan OATP1B3-kuljetinproteiinin toiminnan tutkimiseen käytettävä *in vitro*-menetelmä sekä määritetään kolmen OATP1B3- geneettisen variantin sekä yhden keinotekoisen variantin kuljetusaktiivisuus.

2 OATP1B3-KULJETINPROTEIINI

2.1 Transkription säätely ja post-translationalinen muokkaus

Kuljetinproteiinien ekspressiota ja toimintaa voidaan säädellä transkriptionaalisella, translaationaalisella sekä post-translationalaalisella tasolla (Powell ym. 2014). Tutkimukset OATP1B3-kuljetinproteiinin ekspression säätelystä keskittyvät kuitenkin lähinnä transkription sekä translaation jälkeiseen säätelyyn. Vavricka kumppaneineen (2004) selvittivät, että *SLCO1B3*-geenin transkriptiota voidaan hillitä inaktivoimalla geenin promoottoria maksan transkriptiotekijä HNF3 β :lla (hepatocyte nuclear factor 3 β) huh7-soluissa. Lisäksi transkriptiota on kyetty induktoimaan aktivoimalla geenin promoottoria transkriptiotekijä HNF1 α :lla (hepatocyte nuclear factor 1 α) tai sappihappo-välitteisesti FXR:llä (farnesoid X reseptori/sappihapporeseptori), joka säätelee ensisijaisesti sappihappojen kuljetukseen tai metaboliaan osallistuvien proteiinien transkriptiota (Jung ym. 2001; Jung ym. 2002). Lisäksi *SLCO1B3*-geenin transkriptiota on kyetty aktivoimaan kasvuhormonilla ja prolaktiinilla, jotka paransivat Stat5 (signal transducers and activators of transcription 5) -transkriptiotekijän kiinnittymistä geenin promoottorialueeseen ihmisen maksan karsinoomasoluissa, HepG2-soluissa (Wood ym. 2005).

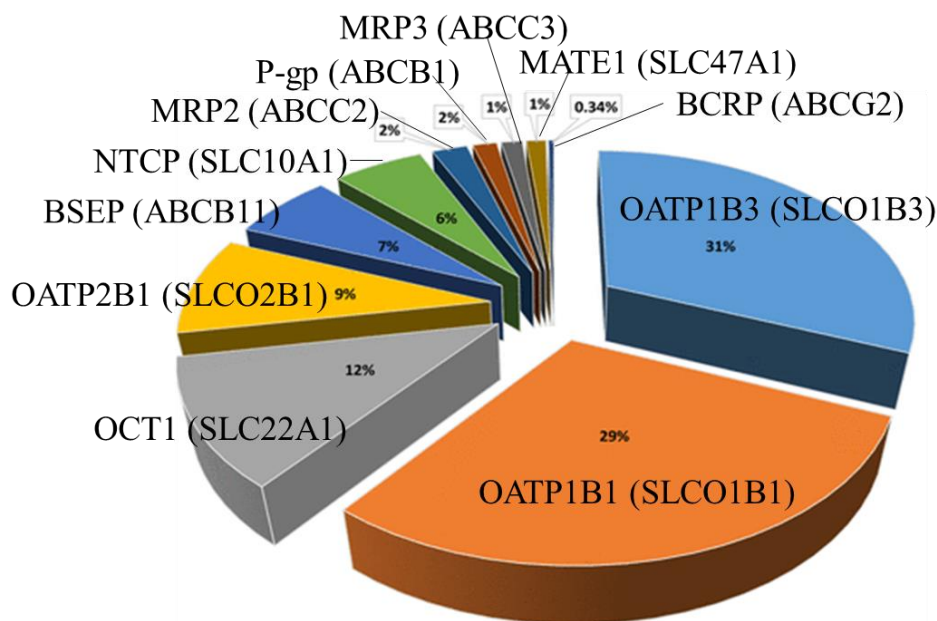
OATP1B3-proteiinin fosforylaation ja ubikitinaation on tutkittu vaikuttavan proteiinin toimintaan (Powell ym. 2014; Alam ym. 2017). Proteiinien seriini- ja treoniini-amino-happotähteitä voidaan fosforyloida PKC (proteiinikinaasi C) -isoentsyymien toimesta (Mochly-Rosen ym. 2012). Powell työryhmineen (2014) selvittivät, että OATP1B3-proteiinin fosforylaatio PKC:n aktivaation seurauksena heikensi OATP1B3-spesifisen substraatin, kolekystokiniini 8:n (CCK8), akkumulaatiota humaani Sandwich-viljeltyihin hepatosyytteihin. PKC:n aktivaatio PMA:lla (forboli-12-myristaatti-13-asetaatilla) ei aiheuttanut välitöntä CCK8 akkumulaation heikentymistä, vaan se huomattiin viiveellä. Käsittely PKC-inhibiittorilla BIM:llä (bisindolyyylimaleimidi) esti PMA:n vaikutuksen ja CCK8 soluunotto säilyi ennallaan. Fosforylaation arvellaan vaikuttavan OATP1B3-proteiinin konformaatioon ja sen seurauksena proteiinin toimintaan, koska proteiinimääriin koko solussa ja solukalvolla ei havaittu olevan vaikutusta.

Ubikitinaatiolla puolestaan on havaittu olevan merkitystä muun muassa proteiinien hajoamisessa, solusyklin kontrolloinnissa ja signaalitransduktiossa (Hershko ja Ciechanover 1992). Proteiinien lysiini-aminohappoihin konjugoidut 76-aminohapon ubikitiini-molekyylit voivat altistaa sen proteosomi-välitteiselle hajoamiselle solun sisällä. Alam kumppaneineen (2017) havaitsivat, että OATP1B1- ja OATP1B3-kuljetinproteiinit voivat olla ubikitiini-säädelyjä, sillä proteosomin inhibitio multippelin myelooman hoidossa käytettävällä bortezomibilla lisäsi ubikitiinillä konjugoitujen proteiinien määriä HEK293-FLAG-OATP1B1 ja -OATP1B3-soluissa (human embryonal kidney cells, ihmisalkion munuaissoluissa). Inhibiointi laski samalla CCK8 maksimaalista kuljetusnopeutta (V_{\max}) HEK293-OATP1B3 soluissa. Bortezomibi ei kuitenkaan aiheuttanut muutoksia OATP1B3-proteiinin solukalvoekspressiossa. Kuitenkaan riittävää tietoa mekanismista, jolla bortezomibi aiheutti CCK8:n V_{\max} :n alenemisen, ei ole.

OATP1B3-proteiinista on löydetty myös N-glykosyloituja alueita, sillä proteiinin deglykosylaatio N-glykosidaasi F:llä vähensi sen molekyylipainoa 120 kDa:sta 65 kDa:iin huomaani hepatosyyteissä (Konig ym. 2000). N-glykosylaatiolla tarkoitetaan proteiinin translaation jälkeistä muokkausta, jossa hiilihydraatteja eli glykaaneja liitetään proteiinin asparagiiniaminohappoon N-glykosididisidoksella. N-glykosylaatiolla on osoitettu olevan vaikutusta muun muassa OATP1B1-proteiinin solukalvoekspressioon (Yao ym. 2012). OATP1B1-kuljetinproteiinin N-glykosylaation häirintä mutatoimalla kolme N-glykosylaatiokohtaa (Asn134Glu, Asn503Glu ja Asn516Glu) vähensi proteiinin kulkeutumista solukalvolle, kuljetusaktiivisuutta sekä stabiilisuutta OATP1B1-transfektoiduissa HEK293-soluissa. OATP1B3-proteiinin glykosylaation on osoitettu puolestaan eroavan *in vitro* eri soluja käytettäessä (Konig ym. 2000; Letschert ym. 2004). Heikentyneen glykosylaation huomattiin myös vähentävän OATP1B3-varianttien Gly522Cys ja Gly583Glu korkeasti glykosyloidun muodon kalvolokalisaatiota MDCKII-soluissa (Letschert ym. 2004). Tutkimuksissa käytetyillä soluilla voi siis olla vaikutusta proteiinin glykosylaatioon ja sen seurauksena toimintaan tai sijaintiin solussa.

2.2 Rakenne ja jakautuminen

OATP1B3 on pääasiallisesti maksassa esiintyvä kuljetinproteiini (Konig ym. 2000). Sitä on arvioitu olevan eniten yhdestätoista maksassa esiintyvistä kuljetinproteiinista (Kuva 2). Sen aminohappokoostumus on 80 %:sti identtinen samaan alaheimoon kuuluvan maksassa esiintyvän OATP1B1 (OATP-C, LST-1) -kuljetinproteiinin kanssa, joka koostuu 691 aminohaposta (Konig ym. 2000). *SLCO1B3*-geeni sijaitsee kromosomissa 12. Villityypin transkriptin on arvioitu koostuvan 14 koodaavasta eksonista ja OATP1B3-kuljetinproteiinin 702 aminohaposta.

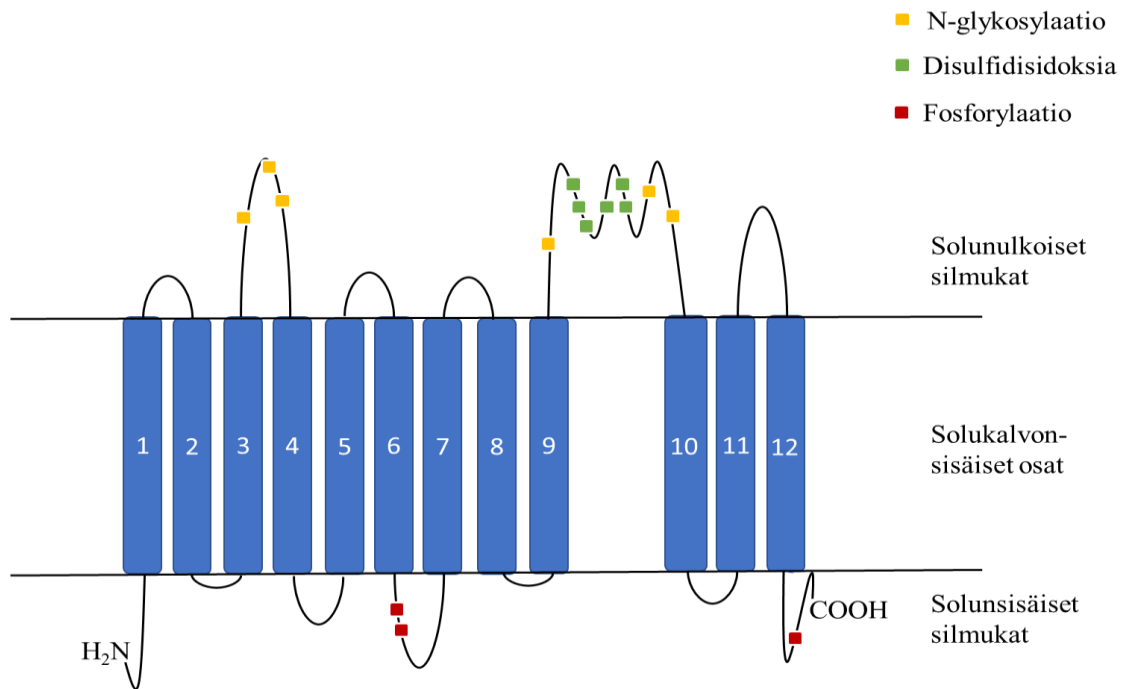


Kuva 2. Arvio 11 kuljetinproteiinien jakautumisesta maksassa terveillä kaukaasialaisilla aikuisilla (Burt ym. 2016). OCT, organic cation transporter, orgaanisten kationien kuljetinproteiini; BSEP, bile salt efflux pump, sappisuolojen effluksi-kuljetinproteiini; MATE, multidrug and toxin extrusion protein, monilääke ja toksiini ekstruusioproteiini; P-gp, P-glycoprotein, P-glykoproteiini; NTCP, sodium taurocholate cotransporting polypeptide, natriumtaurokolaatin kotransportteri; MRP, multidrug resistance protein, monilääkeresistenssi proteiini.

OATP-kuljetinproteiinien rakenne koostuu alueista, joilla on merkitystä niiden toiminnan, solunsisäisen kulkeutumisen ja sijainnin säätelyssä (Murray ja Zhou 2017). Niiden

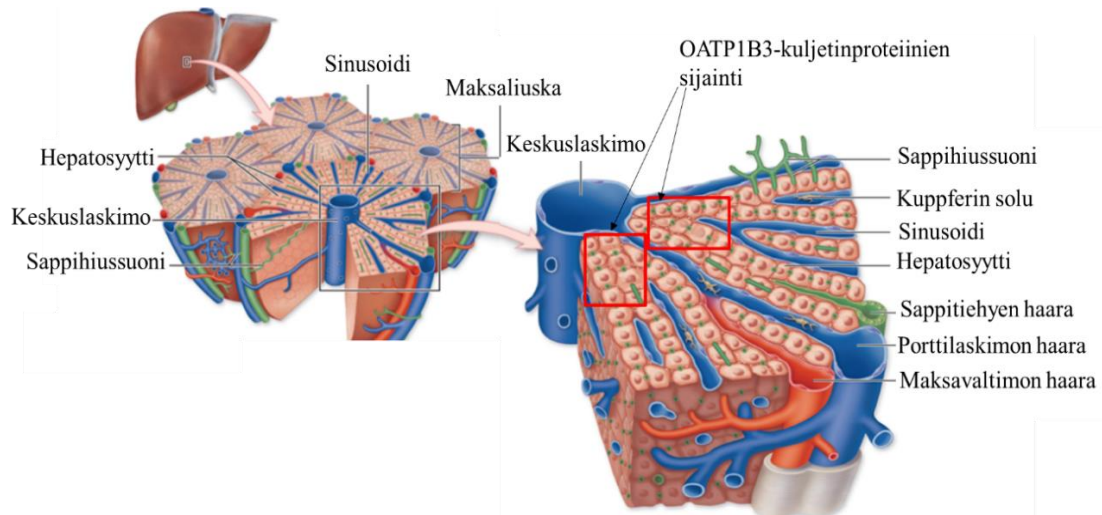
3D-rakenteissa on yhtäläisyyksiä ja niiden aminohapposekvensseistä on löytynyt konservoituneita aminohappoja (Hagenbuch ja Meier 2003). OATP-kuljetinproteiinien rakennetta on ennustettu erilaisilla tietokoneavusteisilla ohjelmilla, mutta tarkkaa kristallirakennetta ei vielä ole saatavilla (Hagenbuch ja Meier 2003; Letschert ym. 2004; Schwarz ym. 2011; Murray ja Zhou 2017). Niiden on arvioitu koostuvan 12 solukalvonsisäisestä osasta (transmembrane domain, TMD), kuudesta solunulkoisesta silmukasta (extracellular loop, ECL), viidestä solunsisäisestä silmukasta (intracellular loop, ICL) sekä N- ja C-terminaalisista hännistä, jotka suuntautuvat sytosoliin päin (Abe ym. 2001; Hagenbuch ja Meier 2003).

OATP-proteiineille tyypillistä on suuri ECL5, joka sijaitsee TMD9 ja TMD10 välillä ja sisältää 10 konservoitunutta kysteiini-aminohappoa (Hagenbuch ja Meier 2003; Hanggi ym. 2006). OATP1B3-kuljetinproteiinin kanssa samaan yläheimoon kuuluvan OATP2B1-kuljetinproteiinin ECL5:n kysteiini-aminohappojen mutatointi alaniinilla heikensi proteiinin kulkeutumista solukalvolle, toimintaa sekä disulfidididosten muodostumista (Hanggi ym. 2006). Lisäksi ainakin ECL2- ja ECL5-alueiden on esitetty olevan N-glykosyloituvia OATP-kuljetinproteiineilla (Hagenbuch ja Meier 2003). OATP-proteiineista löytyy myös potentiaalisia ubiquitinaatiolle alttiita lysiini-aminohappotähteitä ICL3:sta sekä fosforylaatiolle alttiita seriini- ja treoniini-aminohappotähteitä solunsisäisistä silmukoista sekä C-terminaalisesta hännästä (Murray ja Zhou 2017). Gui ja Hagenbuch (2008) osoittivat, että TMD10:ssä sijaitsevat varauksettomat ja polaariset aminohapot Tyr537, Ser545 ja Thr550 ovat merkityksellisiä CCK8 kulkeutumisessa OATP1B3-välitteisesti. Glaeser kumppaneineen (2010) puolestaan osoitti, että kaksi positiivisesti varautunutta aminohappoa OATP1B3-aminohapposekvenssissä TMD1:n Lys41 ja TMD11:sta Arg580 ovat tärkeitä kuljetinproteiinin kyvylle kuljettaa pravastatiinia ja BSP:tä. Edellä mainitut aminohapot ovat konservoituneita OATP1-heimossa (Lys41) ja OATP-yläheimossa (Arg580), joten tutkijoiden mukaan ne voivat olla merkityksellisiä myös muiden OATP-kuljetinproteiinien kuljetuskyvyille. Kuvassa 3 esitetään OATP1B3-kuljetinproteiinin ennustettu rakenne.



Kuva 3. Yksinkertaistettu OATP1B3-kuljetinproteiinin rakenne solukalvolla. Kuvan toteuttamisessa on hyödynnetty Protter-ohjelman ennustettua rakennetta OATP1B3-kuljetinproteiinista (Omasits ym. 2014).

Konig työryhmineen (2000) löysivät *SLCO1B3*-geenin ja selvittivät, että OATP1B3-proteiinia ilmenee hepatosyyttien basolateraalisolukalvolla. Lisäksi heidän mukaansa suurin osa OATP1B3-kuljetinproteiineista sijaitsee hepatosyyteissä lähellä keskuslaskimoa, johon veri virtaa sinusoidien kautta porttilaskimon ja maksavaltimon haaroista (Kuva 4). Lisäksi OATP1B3-mRNA:ta on löytynyt munasarjoista, eturauhasesta, virtsarakosta sekä rintakudoksesta, mutta toistaiseksi ei ole varmuutta ekspressoituuko OATP1B3-proteiini edellä mainituissa kudoksissa (Alam ym. 2018b). OATP1B3-proteiinia on puolestaan löydetty ihmisen haiman Langerhansin saarekkeista sekä glukagonia tuottavissa α -soluista että insuliinia tuottavista β -soluista (Kim ym. 2017). Normaalisti solukalvolla ilmenevän OATP1B3-kuljetinproteiinin osoitettiin kuitenkin ilmenevän α - ja β -solujen sisällä. Sen toiminta edellä mainituissa soluissa on vielä epäselvää.



Kuva 4. Maksan rakenne ja OATP1B3-kuljetinproteiinien sijainti maksassa. Kuva muokattu kirjasta Junqueira's basic histology : text & atlas (Mescher 2018).

OATP1B3:ta on maksan lisäksi havaittu ihmisillä esiintyvissä syöpäkasvaimissa. Immunohistokemiallisen värjäyksen perusteella Abe kumppaneineen (2001) päättelivät, että OATP1B3 voi ekspressoitua vatsan, paksusuolen ja haiman syöpäkudoksissa sekä paksusuolen syövästä metastoituneissa imusolmukkeissa. Heidän mukaansa OATP1B3 voi ekspressoitua myös monissa vatsa-suolikanavan syöpäsolulinjoissa. OATP1B3-kuljetinproteiinista on kuitenkin löydetty villityypistä lyhempää syöpäspesifistä muotoa (Thakkar ym. 2013). Abe työryhmineen (2001) käyttivät tutkimuksessaan vasta-ainetta, joka sitoutui kuljetinproteiinin C-terminaaliseen osaan, josta ei voida päätteellä onko kysessä syöpäspesifinen muoto vai villityyppi. Myöhemmin OATP1B3-villityypin mRNA:ta havaittiin kuitenkin pieniä määriä munasarjojen, eturauhasen, virtsarakon ja rintarauhasen syöpäkudoksissa (Alam ym. 2018b). Koska OATP1B3-substraatteina on syöpälääkeaineita kuten metotreksaatti, dosetakseli ja paklitakseli, sen sijainnilla syöpäkasvaimissa voi olla merkitystä syöpälääkkeiden kuljetuksessa syöpäsoluihin ja siten syöpälääkevasteissa (Abe ym. 2001; Smith ym. 2005).

2.3 Syöpäspesifinen OATP1B3-variantti

Etenkin syöpäkudoksista on löytynyt OATP1B3-villityypistä poikkeavaa muotoa, OATP1B3-CT (Thakkar ym. 2013; Alam ym. 2018b). Sen mRNA:ta on havaittu esimerkiksi keuhko-, munasarja-, virtsarakon, vatsasuolikanavan, rinta-, haima- sekä eturauhas-syöpä-kudoksista. Pieniä määriä mRNA:ta on löydetty myös terveistä kudoksista kuten munasarjoista, eturauhasesta, virtsarakosta ja keuhkoista (Alam ym. 2018b). OATP1B3-CT-proteiinia on puolestaan löydetty haiman ja paksusuolen syöpäkudoksista (Thakkar ym. 2013). Thakkarin työryhmän (2013) mukaan OATP1B3-CT:tä koodaavassa geenissä *SLCO1B3*-villityypin eksonit 1 ja 2 ovat korvautuneet vaihtoehtoisella eksonilla ja OATP1B3-CT-proteiinista puuttuu ensimmäiset 28 aminohappoa sen N-terminaalisesta osasta eli se koostuu 674 aminohaposta, jotka ovat identtisiä villityypin kanssa.

OATP1B3-CT-proteiinin solunsisäistä lokalisaatiosta on saatu eriäviä tuloksia, mutta etenkin syöpäsoluissa solukalvoekspression havaittiin heikentyneen (Imai ym. 2013; Thakkar ym. 2013). OATP1B3-CT:n ekspressiotaso oli heikentynyt villityyppiin verrattuna HCT116-soluissa (Human Colorectal Carcinoma, ihmisen kolorektaalikarsinooma), HCT8-soluissa (Human ileocecal adenocarcinoma, ihmisen ileosekaaliadenokarsinooma) sekä Panc-1-soluissa (haimasyöpäsoluissa) (Thakkar ym. 2013). Lisäksi endogeenisesti OATP1B3-CT:tä expressoivissa HCT116-soluissa sekä ohimenevästi transfektoiduissa HCT8-soluissa CT-variantin tutkittiin sijaitsevan lähinnä solujen sytosolissa, kun taas OATP1B3-villityyppi sijaitsi enimmäkseen HCT8-solujen solukalvolla. Myös Chun työryhmineen (2017) osoitti, että OATP1B3-CT:llä ja villityypillä transfektoiduissa HEK293T-, HCT8- ja MDCKII-soluissa, OATP1B3-CT sijaitsi enimmäkseen solujen sytosolissa, kun taas villityyppiä ilmeni sekä sytosolissa että solukalvolla. Sitä vastoin Imai kumppaneineen (2013) havaitsivat, että OATP1B3-CT-transfektoiduissa HEK293-soluissa proteiini sijaitsi solukalvolla.

Syöpäspesifisen variantin solukalvoekspression heikentymistä on pyritty selittämään esimerkiksi heikommalla glykosylaatiolla (Thakkar ym. 2013). Immunoblottausanalyysi ja

käsittely PNGaasi F:llä paljasti OATP1B3-CT:n olevan vähemmän glykosyloitu kuin villityyppi, sillä sen molekyylipaino ei käsittelyn jälkeen vähentynyt yhtä paljon kuin villityypin. Thakkarin ja kumppaneiden (2013) mukaan OATP1B3-CT voi olla alttiimpi proteosomaaliselle hajoamiselle kuin villityyppi, sillä käsittely proteosomi inhibiittorilla, epoxomisiinilla, johti variantin, mutta ei villityypin molekyylipainon nousuun, mikä viittaa ubiquitiinin kertymiseen proteiiniin ja altistaa sen proteosomi-välitteiselle hajoamiselle. Chun kumppaneineen (2017) puolestaan selvittivät OATP1B3-kuljetinproteiinin N-terminaaliset aminohapot, joilla on merkitystä sen kulkeutumisessa solukalvolle tutkimalla OATP1B3-proteiineja, joista puuttuu joko 11, 23 tai 28 aminohappoa. Tutkimuksen mukaan aminohapoilla 12-28 on todennäköisimmin merkitystä proteiinin lokalisaatiossa solukalvolle. Proteiinit, joista puuttui ensimmäiset 23 tai 28 aminohappoa N-terminaalista osasta eivät ilmenneet solukalvolla ja sytosolissakin ilmeneminen oli heikkoa toisin kuin villityypin ja variantin, josta puuttui 11 aminohappoa.

OATP1B3-CT:n kuljetusaktiivisuuden heikkenemistä on havaittu etenkin syöpäsolulinjoissa (Thakkar ym. 2013; Chun ym. 2017). OATP1B3-CT-transfektoiduissa HEK293T-soluissa fluoreseiinin soluunotto oli heikompaa villityyppiin nähden, mutta 3,3 kertaa suurempaa kuin vektorikontrollilla huolimatta sen vähäisestä solukalvo ilmenemisestä (Chun ym. 2017). OATP1B3-CT:n inhibointi rifampisiinilla heikensi fluoreseiinin soluunottoa kontrollin tasolle. Thakkar kumppaneineen (2013) tutkivat myös syöpäspesifisen OATP1B3-proteiinin kuljetusaktiivisuutta väliaikaisesti transfektoiduissa haiman ja paksusuolen syöpäsoluissa (HCT116, HCT8, Panc-1). Tulosten mukaan CT-variantti kykenee kuljettamaan CCK8:aa, mutta soluunotto on heikompaa villityyppiin verrattuna. Imai työryhmineen (2013) puolestaan osoitti, että fluvastatiinin, rifampisiinin, E₂17βG ja Gd-EOB-DTPA soluunotto OATP1B3-CT-välitteisesti oli merkittävästi suurempaa kuin mock-kontrollilla HEK293-soluissa. Lisäksi tutkijoiden mukaan fluvastatiinin ja rifampisiinin OATP1B3-CT-välitteinen soluunotto oli kvalitatiivisesti verrattavissa OATP1B3-villityyppiin. Thakkarin työryhmä (2013) eikä Imain työryhmä (2013) määrittänyt OATP1B3-villityypin ja OATP1B3-CT:n kuljetusaktiivisuuksia rinnakkain vaan erillisissä kokeissa.

Tulosten ristiriitaisuuden takia edellä mainittujen tutkimusten perusteella ei voida tehdä johtopäätöksiä syöpäspesifisen OATP1B3-kuljetinproteiinin toiminnasta syöpäsoluissa. Koska OATP1B3-substraatteina on syöpälääkkeitä, syöpäspesifisen OATP1B3-variantin toiminnalla tai toimimattomuudella syöpäkudoksissa saattaa olla vaikutusta syöpälääkevasteisiin. Kuitenkin sen biologinen merkitys syöpäsoluissa on vielä määrittelemättä.

2.4 Toiminta ja kuljetusmekanismi

Oraalisesti annostellun lääkeaineen, jonka lääkevaikutuskohde on systeemiverenkierron välityksellä saavutettavissa, tulee kulkeutua vatsa-suolikanavaan, liueta ja imeytyä ohutsuolen seinämän läpi (Kalliokoski ja Niemi 2009). Imeytymisen jälkeen lääkeaine kulkeutuu porttilaskimoveren mukana maksaan, josta osa säilyy muuttumattomana ja jakautuu systeemisen verenkierron välityksellä eri kudoksiin ja lopulta eliminoiduu maksan kautta tai erittyy virtsan mukana. Maksassa muun muassa OATP1B1-, OATP1B3- ja OATP2B1-kuljetinproteiinit kuljettavat veren mukana kulkeutuneita endogeenisiä aineita sekä lääkeaineita hepatosyyttien sisään ja osallistuvat siten maksan kautta tapahtuvan eliminaation ensimmäiseen vaiheeseen (Hagenbuch ja Meier 2003).

OATP-kuljetinproteiinien kuljetusmekanismia ei täysin tunneta. Tutkimusten mukaan niiden on arvioitu kuljettavan substraatteja natriumista riippumattomasti konsentraatiogradientin suuntaan eli vastaavan helpotetusta diffuusiosta (Jacquemin ym. 1994; Kullak-Ublick ym. 1995; Mahagita ym. 2007). Kuljetusmekanismiin on liitetty myös bikarbonaatin (HCO_3^-) samanaikainen effluksi ja glutationin (GSH) samanaikainen influksi (Satlin ym. 1997; Briz ym. 2006; Leuthold ym. 2009). Toisaalta glutationin vaikutusta samanaikaiseen sappihappojen soluun ottoon OATP1B3-välitteisesti ei kyetty toistamaan myöhemmin (Mahagita ym. 2007). Mahagita kumppaneineen (2007) kuitenkin arvioi, että OATP1B1- ja OATP1B3-välitteinen kulkeutuminen olisi kaksisuuntaista ja riippuvan substraattigradientista solukalvon vastakkaisilla puolilla, mutta se ei olisi suoraan kytköksissä toisen substraatin/ionin samanaikaiseen kulkeutumiseen tai ioninvaihtoon kalvon läpi. Tähän tulokseen he tulivat, koska yhdelläkään tutkituista todennäköisistä samanaikaisesti kuljetettavista ioneista tai ioninvaihtoon osallistuvista ioneista (mm. GSH,

SO_4^{2-} tai HCO_3^-) ei ollut merkittävää vaikutusta kuljetusnopeuteen, kuljetusta havaittiin huolimatta siitä, ettei kuljetinproteiinia altistettu vastakkaiseen suuntaan kuljetettavilla ioneilla ja vähäistä trans-stimulaatiota havaittiin vain, kun tunnetut orgaaniset substraatit sijoitettiin solukalvon vastakkaisille puolille.

Myös alhaisemmalla ekstrasellulaarisella pH:lla on havaittu olevan vaikutusta OATP-kuljetinproteiinien toimintaan (Leuthold ym. 2009). Esimerkiksi taurokolaatin, estroni-3-sulfaatin (E_3S) ja tyroksiinin OATP1B3-välitteinen kulkeutuminen lisääntyi pH:ssa 6.5 verrattuna pH:hon 8. Vaikutuksen arvellaan johtuvan joko substraatin protonoitumistilasta tai kuljetinproteiinin sitoutumiskohdan rakenteellisesta muutoksesta pH-muutosten vaikutuksesta. Lisäksi pH-muutokseen reagoineista OATP-proteiineista löytyi TMD3:sta konservoitunut histidiini-aminohappotähde, jonka protonoitumisen pH:ssa 6.5 arveltiin lisäävän OATP-proteiinien kuljetusaktiivisuutta. Vaikka hepatosyyttien pH pysyttelee noin 7.2:ssa ja hepatosyyttejä huuhtelevan veren pH taas 7.4:ssä, alhaisen ekstrasellulaarisen pH:n kliinistä merkitystä maksan OATP-proteiinien toimintaan selitettiin solukalvon ulkopuolella olevan diffuusiokerroksen avulla (Boyer ym. 1992; Leuthold ym. 2009). Se hidastaisi solusta ulos kuljetettujen protonien (H^+ -ionien) diffuusiota solukalvon läheltä ja alentaisi siten pH:ta heti solukalvon ulkopuolella, mikä voisi johtaa OATP-välitteisen soluunoton stimulaatioon.

2.5 Substraatit

OATP-kuljetinproteiineilla on laaja ja päällekkäinen substraattispesifisyys, mikä tarkoittaa usean substraatin soluunottoa usean eri OATP-proteiinin välityksellä (Hagenbuch ja Meier 2004). Tällöin tietyn kuljetinproteiinin toimimattomuus tai toiminnan heikentyminen ei välttämättä vaikuta substraatin soluunottoon merkittävästi *in vivo*, sillä substraatti voidaan edelleen kuljettaa toisen kuljetinproteiinin välityksellä soluun. Lisäksi eri solumallien käyttö *in vitro*-soluunottokokeissa voi vaikuttaa substraatiksi luokitteluun. Esimerkiksi dosetakselin soluunottoa ei havaittu OATP1B1-transfektoiduissa *Xenopus laevis* oosyyteissä, vaikka HEK293-soluissa sekä CHO (Chinese hamster ovary) -soluissa

havaittiin (de Graan ym. 2012). Tarkkaa tietoa OATP-substraattien rakenteellisista ominaisuuksista ei ole saatavana. Hagenbuchin ja Meierin (2004) mukaan substraatit ovat melko suuria (>450 Da), anionisia ja amfipaattisia molekyylejä, jotka fysiologisissa olosuhteissa ovat usein sitoutuneina albumiiniin. Myös steroidirakenteen sisältävät yhdisteet ja niiden konjugaatit sekä pienet sykliset ja lineaariset peptidit voivat kulkeutua OATP-kuljetinproteiinien avustamana soluihin (Hagenbuch ja Meier 2003). Lisäksi OATP1B3-välitteisesti on raportoitu kulkeutuvan myös neutraaleja hydrofobisia (mm. dosetakseli), kahtaisionin sisältäviä (mm. H_1 -reseptori antagonisti, feksofenadiini) sekä kationisia (mm. imatinibi) yhdisteitä (de Graan ym. 2012; Zimmerman ym. 2013; Izumi ym. 2018).

OATP1B3- ja OATP1B1-kuljetinproteiinien rakenteellisen samankaltaisuuden takia niillä on runsaasti päällekkäistä substraattispesifisyyttä. Niiden substraateiksi on luokiteltu esimerkiksi HMG-CoA-reduktaasin estäjät eli statiinit, (lukuun ottamatta lovastatiinia, joka kulkeutuu OATP1B1-välitteisesti), antibiootti rifampisiini, angiotensiini II reseptorin salpaajat valsartaani ja olmesartaani, kaksoisendoteliinireseptoriantagonisti bosentaani, HIV-proteaasin estäjistä sakinaviiri ja lopinaviiri, BSP, suoliston tulehdusreaktioita hillitsevä mesalatsiini, metotreksoatti, ACE-estäjä enalapriili sekä useat syöpälääkkeet kuten paklitakseli ja dosetakseli, tyrosiinikinaasin estäjät (kritisotinibi, nilotinibi, patosopanibi ja sorafenimibi) ja syöpälääke irinotekaanin aktiivinen metaboliitti SN-38 (Cui ym. 2001; Vavricka ym. 2002; Nozawa ym. 2005; Liu ym. 2006; Nakagomi-Hagihara ym. 2006; Yamashiro ym. 2006; Treiber ym. 2007; Yamaguchi ym. 2008; Hartkoorn ym. 2010; König ym. 2011; Svoboda ym. 2011; de Graan ym. 2012; van de Steeg ym. 2013; Zimmerman ym. 2013; Kunze ym. 2014). Myös monet endogeeniset aineet kuten sappihapot taurokolaatti, glykokolaatti, koolihappo ja deoksikoolihappo, hormonit tyroksiini, trijodityroniini, 17β -estradioliglukuronidi ($E_217\beta G$) ja dehydroepiandrosteroni-3-sulfaatti (DHEAS), leukotrieeni C_4 sekä bilirubiiniglukuronidit, voivat hyödyntää sekä OATP1B1- että OATP1B3-proteiineja kulkeutuessaan solukalvon läpi (Kullak-Ublick ym. 2001; van de Steeg ym. 2012; Suga ym. 2017).

OATP2B1- ja OATP1A2-kuljetinproteiineilla, joita esiintyy maksan lisäksi laajemmin eri elimissä, on myös päällekkäistä substraattispesifisyyttä OATP1B1- ja OATP1B3-proteiinien kanssa (Kalliokoski ja Niemi 2009; McFeely ym. 2019). OATP2B1-substraatteja ovat myös esimerkiksi statiinit, BSP, mesalatsiini ja taurokolaatti (Konig ym. 2011; McFeely ym. 2019). OATP1A2-substraatteja puolestaan ovat esimerkiksi BSP sekä E₂17βG, DHEAS, imatinibi, taurokolaatti, glykokolaatti, tyroksiini ja trijodityroniini (Kullak-Ublick ym. 2001; Hu ym. 2008).

OATP1B3-kuljetinproteiinilla on myös substraatteja, joiden kulkeutuminen solujen sisään on riippuvainen ensisijaisesti sen toiminnasta. Niistä esimerkkinä CCK8, jota käytetään usein mallisubstraattina, kun tutkitaan OATP1B3-kuljetinproteiinin toimintaa (Ismair ym. 2001; Giacomini ym. 2010). Lisäksi verrattuna OATP1B1, OATP2B1 sekä OATP1A2-kuljetinproteiineihin, enimmäkseen OATP1B3-välitteisesti raportoitiin kulkeutuvan sydänglykosidi digoksiini sekä anioniset peptidit DPDPE ([D-penisillamiini^{2,5}] enkefaliini) ja BQ-123 (endoteliinireseptoriantagonisti) (Kullak-Ublick ym. 2001). Myöhemmin digoksiinin kulkeutumista OATP1B3-välitteisesti ei havaittu, mutta samalla selvitettiin, että sydänglykosidi ouabaiini kulkeutuu OATP1B3-välitteisesti (Gozalpour ym. 2014). Muita OATP1B3-välitteisesti kulkeutuvia substraatteja ovat insuliinineritystä lisäävistä sulfonyyliureajohdannaisista glipitsidi ja angiotensiini II reseptorin salpaaja telmisartaani (Ishiguro ym. 2006; Chen ym. 2018). Taulukossa 1 on esimerkkejä *in vitro* OATP1B3-välitteisesti kulkeutuvista sekä OATP1B1- ja OATP1B3-välitteisesti kulkeutuvista substraateista.

Taulukko 1. OATP1B1- ja OATP1B3-lääkeainesubstraatteja ja muita eksogeenisiä substraatteja.

Substraatti	OATP1B1 ja OATP1B3	1) K _m (μM) ja 2) K _m (μM)	Viite
atorvastatiini	1) x 2) x	1) 0.77 2) 0.73	Karlgren ym. 2012
fluvastatiini	1) x 2) x	1) 2.4 2) 7.0	Kopplow ym. 2005
pitavastatiini	1) x 2) x	1) 3.0 2) 3.3	Hirano ym. 2004
pravastatiini	1) x 2) x	1) 27-104 2) 228	Kindla ym. 2011, Izumi ym. 2018
rosuvastatiini	1) x 2) x	1) 4.0-7.3 2) 9.80	Ho ym. 2006
serivastatiini	1) x 2) x	1) 0.86-1.41 2) 1.29-1.57	Izumi ym. 2018
simvastatiini	1) x 2) x	1) - 2) -	Kunze ym. 2014
bosentaani	1) x 2) x	1) 44 2) 141	Treiber ym. 2007
BSP	1) x 2) x	1) 0.14 2) 3.3	Cui ym. 2001
dasatinibi, gefitinibi, imatinibi, kritisotinibi, nilotinibi, patsopanibi, sorafenibi, vandetanibi, vemurafenibi	2) x 2) x 2) x 1) x 2) x 1) x 2) x 1) x 2) x 1) x 2) x 2) x 2) x	2) - 2) - 2) - 1) - 2) - 1) - 2) - 1) - 2) - 1) 23.5 2) - 2) - 2) -	Zimmerman ym. 2013
dosetakseli	1) x 2) x	1) 7.6 2) 2.2	de Graan ym. 2012
paklitakseli	1) x 2) x	1) 0.6 2) 1.6	Svoboda ym. 2011
DPDPE, BQ-123	2) x 2) x	2) - 2) -	Kullak-Ublick ym. 2001
enalapriili	1) x 2) x	1) 262 2) -	Liu ym. 2006
feksofenadiini	1) x 2) x	1) 61.6 2) 9.49-19.2	Izumi ym. 2018
glibenklamidi	1) x 2) x	1) 1.24 2) 15.36	Chen ym. 2018, Izumi ym. 2018
glipitsidi	2) x	2) 41.29	Chen ym. 2018
mesalatsiini	1) x 2) x	1) 55.1 2) 77.4	Konig ym. 2011
metotreksaatti	1) x 2) x	1) - 2) 24.7	Abe ym. 2001
mykofenolihappo- glukuronidi	1) x 2) x	1) - 2) -	Picard ym. 2010
olmesartaani	1) x 2) x	1) 42.6 2) 71.8	Nakagomi-Hagihara ym. 2006
telmisartaani	2) x	2) 0.81	Ishiguro ym. 2006
valsartaani	1) x 2) x	1) 1.39 2) 18.2	Yamashiro ym. 2006
ouabaiini	2) x	2) -	Gozalpour ym. 2014
rifampisiini	1) x 2) x	1) 1.5 2) 2.3	Vavricka ym. 2002
sakinaviiri, lopinaviiri	1) x 2) x 1) x 2) x	1) - 2) - 1) - 2) -	Hartkoorn ym. 2010
SN-38	1) x 2) x	1) - 2) -	Yamaguchi ym. 2008, Nozawa ym. 2005

1) Viittaa OATP1B1-kuljetinproteiiniin ja 2) OATP1B3-kuljetinproteiiniin.

2.6 HMG-CoA-reduktaasin estäjien farmakokineettisiä lääke-lääkeinteraktioita

Farmakokineettisellä lääke-lääkeyhteisvaikutuksella (lääke-lääkeinteraktiolla, Drug-drug interaction, DDI) tarkoitetaan lääkeainetta metaboloivan entsyymin tai sitä kuljettavan proteiinin inhibitiota (toiminnan estyminen) tai induktiota (toiminnan lisääntyminen) toisella lääkeaineella usein samanaikaisen annostelun seurauksena (Shitara 2011). Myös fysiologisten prosessien muutokset lääkeaineiden vaikutuksesta, esimerkiksi verenvirtausnopeuden muuttuminen toisen lääkeaineen imeytymispaikassa, voidaan luokitella farmakokineettisiin interaktioihin (Rowland ja Tozer 2011). Farmakokineettiset interaktiot voivat liittyä lääkeaineen imeytymiseen, jakautumiseen, metaboliaan tai erittymiseen. Ensijaisesti maksassa esiintyviin OATP1B1- ja OATP1B3-kuljetinproteiineihin liittyvät interaktiot voivat aiheuttaa muutoksia niiden substraattien maksametabolian kautta tapahtuvassa eliminaatiossa (Shitara 2011). Esimerkiksi inhiboimalla tai induktoimalla molempia tai toista edellä mainituista kuljetinproteiineista voi substraattien plasmapitoisuudet kasvaa tai laskea hepaattisen eliminaation muuttuessa, jos OATP1B1/1B3-välitteinen soluunotto on substraatin permeabiliteettia rajoittava tekijä (Rowland ja Tozer 2011; Shitara 2011). Lääkeaineen plasmapitoisuuden nousu tai lasku voi puolestaan aiheuttaa toksisuutta tai tehon menetyksen. EMA ohjeistaa toteuttamaan DDI-tutkimukset, jos uuden lääkeaineen havaitaan inhiboivan OATP1B1- tai OATP1B3-kuljetinproteiinia, sillä niiden inhibition on havaittu aiheuttavan kliinisesti merkittäviä interaktioita (EMA 2012; Alam ym. 2018a). Johtuen OATP1B1- ja OATP1B3-kuljetinproteiinien rakenteen, substraattien sekä inhibiittorien samankaltaisuuksista, tässä kappaleessa käydään läpi OATP1B1- ja OATP1B3-välitteisiä interaktioita, joiden on tutkittu aiheuttavan muutoksia kolesterolia alentavien HMG-CoA-reduktaasin estäjien (statiinien) farmakokinetiikassa.

OATP1B1-, OATP1B3- ja OATP2B1-kuljetinproteiinien inhibition on havaittu heikentävän statiinien soluunottoa *in vitro* (Noe ym. 2007; Seithel ym. 2007; Chu ym. 2013). Esimerkiksi gemfibrotsiili (200 µM) heikensi fluvastatiinin soluunottoa 90, 70 ja 60 %:sti OATP1B1-, OATP2B1- ja OATP1B3-kuljetinproteiineja ekspressoivissa CHO- ja HEK293-soluissa sekä 25 %:sti humaani hepatosyyteissä (Noe ym. 2007). Pravastatiinin

OATP1B3-välitteinen soluunotto HEK293-soluissa puolestaan heikentyi 100 μM erytromysiinin, klaritromysiinin, roksitromysiini ja telitromysiini altistuksien jälkeen 36, 37, 52 ja 19 %:iin OATP1B3-kontrollista, jota ei inhiboitu makrolidi- tai ketolidi-antibiooteilla (Seithel ym. 2007). Erytromysiini inhiboi pravastatiinin soluunottoa tilastollisesti merkitsevästi myös alhaisella pitoisuudella (10 μM). Lisäksi erytromysiini (100 μM), klaritromysiini (10 μM) sekä roksitromysiini (10 μM) inhiboivat myös OATP1B1-välitteistä pravastatiinin soluunottoa tilastollisesti merkitsevästi ja soluunotto heikentyi noin 45 %:iin, 64 %:iin sekä 65%:iin OATP1B1-kontrollista. Myös hepatiitti C viruslääkkeenä käytetyn bosepreviirin havaittiin inhiboivan OATP1B-substraattien atorvastatiinin ja pitavastatiinin soluunottoa humaani hepatosyyteissä (IC_{50} -arvot 7.2 μM ja 6.3 μM) (Chu ym. 2013).

OATP1B1- ja OATP1B3-välitteisen statiinien soluunoton on tutkittu lisääntyvän tulehduskipulääkkeiden vaikutuksesta *in vitro* (Kindla ym. 2011). Pravastatiinin soluunotto OATP1B3- ja OATP1B1-transfektoiduissa HEK293-soluissa lisääntyi, kun solut altistettiin diklofenaakille tai ibuprofeenille. Koska proteiinien ei juuri havaittu kuljettavan edellä mainittuja tulehduskipulääkkeitä ja solujen altistus ibuprofeenille pienensi pravastatiinin K_m -arvoa ja nosti V_{\max} -arvoa, induktion epäiltiin aiheutuvan allosteerisesta modulaatiosta. Siinä tulehduskipulääke toimii ”soluunoton säätelijänä” sitoutumalla proteiinin allosteeriseen kohtaan ja edistämällä pravastatiinin affiniteettia kuljetinproteiiniin sekä soluunottoa. Tutkijoiden mukaan interaktio voi edistää pravastatiinin akkumulatiota hepatosyytteihin ja johtaa HMG-CoA-reduktaasin inhibition lisääntymiseen. Interaktion kliinistä merkitystä ei kuitenkaan ole arvioitu.

OATP1B1- ja OATP1B3-kuljetinproteiinien inhibition on havaittu aiheuttavan myös kliinisesti merkittäviä interaktioita muun muassa nostamalla statiinien plasmapitoisuuksia sekä pitoisuus-aikakuvaajan pinta-alaa (the area under the curve, AUC). Systeemisen statiini-altistuksen nousu on liitetty myopatia (lihaskudoksen heikkeneminen tai surkastuminen) riskin kasvuun ja vakavimmillaan jopa kuolemaan johtaneeseen raskauttomyosiiniin (lihaskudoksen äkillinen vaurio) (Hougaard Christensen ym. 2019). Esimerkiksi saman aikainen rosuvastatiinin annostelu syöpälääke darolutamidin kanssa nosti rosuvastatiinin

AUC:n sekä C_{\max} :n viisinkertaiseksi verrattuna ainoastaan rosuvastatiinia saaneisiin koehenkilöihin (Zurth ym. 2019). Samalla darolutamidin tutkittiin myös inhiboivan OATP1B1- sekä OATP1B3-kuljetinproteiineja *in vitro*, joka selitti interaktion. OATP1B-proteiineja inhiboivan Hepatiitti C viruslääkkeen, faldapreviirin, annostelu samanaikaisesti atorvastatiiniin ja rosuvastatiinin kanssa nosti statiinien AUC:n jopa 9- ja 15-kertaiseksi sekä C_{\max} :n 34- ja 33-kertaiseksi terveillä vapaaehtoisilla (Sane ym. 2014; Huang ym. 2017). Kokeeseen osallistuneista 32 henkilöstä seitsemällä faldepreviiriä ja atorvastatiinia sekä seitsemällä faldepreviiriä ja rosuvastatiinia saaneista ilmeni myös haittavaikutuksia kuten keskushermosto- ja silmäoireita (Huang ym. 2017). Myös OATP1B-proteiineja inhiboiva antibiootti rifampisiini nosti samanaikaisesti annostellun pitavastatiinin ja rosuvastatiinin AUC- ja C_{\max} -arvoja yli 5- ja yli 8-kertaiseksi terveillä vapaaehtoisilla (Chen ym. 2013; Prueksaritanont ym. 2014). Lisäksi immunosuppressantti siklosporiini A:n on tutkittu olevan OATP1B1/1B3-inhibiittori ja samanaikainen annostelu rosuvastatiinin kanssa 7- ja 11-kertaisti rosuvastatiinin AUC:n ja C_{\max} :n sydämensiirtopotilailla (Simonson ym. 2004; Shitara ym. 2012). Simvastatiinin AUC ja C_{\max} puolestaan yli 7-kertaistuivat munuaisensiirtopotilailla siklosporiini A:n samanaikaisen annostelun seurauksena (Ichimaru ym. 2001).

Hougaard Christensen työryhmineen (2019) suositteli systemaattisen kirjallisuuskatsauksensa perusteella, että CYP3A4-, OATP1B1- ja OATP1B3-inhibiittorin, klaritromysiinin, annostelua samanaikaisesti statiinien kanssa tulisi välttää tai vähintään varoa. Samanaikaisen annostelun seurauksena simvastatiinin ja lovastatiinin AUC:t nousivat yli 5-kertaiseksi, atorvastatiinin ja pitavastatiinin 2-4-kertaiseksi, pravastatiinin noin 2-kertaiseksi sekä fluvastatiinin ja rosuvastatiinin alle 2-kertaiseksi. Lisäksi klaritromysiinin (annos 250-1000 mg/vrk) samanaikainen annostelu atorvastatiinin (n=3, annos 10-40 mg/vrk), lovastatiinin (n=2, annos 40 mg/vrk) ja simvastatiinin (n=11, annos 20-80 mg/vrk) kanssa liitettiin 16 tapauksessa joko raskauden keskeytykseen (n=14) tai myopatiaan (n=2).

OATP1B1- ja OATP1B3-kuljetinproteiineilla on merkittävä rooli statiinien farmakoki-neettisissä interaktioissa ja siten myös niiden geneettisellä variaatiolla voi olla vaikutusta statiini-altistukseen. Etenkin OATP1B1-kuljetinproteiinin geneettisten varianttien

(Asn130Asp ja Val174Ala) on tutkittu nostaneen esimerkiksi pitavastatiinin, atorvastatiinin ja rosuvastatiinin AUC- ja C_{\max} -arvoja (Shitara 2011). Vaikka OATP1B3-kuljetinproteiinin geneettisen variaation merkitys statiini-altistuksissa on vielä selvittämättä, rosuvastatiinin soluunoton on tutkittu heikentyneen tilastollisesti merkitsevästi ihmisillä esiintyvillä OATP1B3-Met233Ile-, -His520Pro- ja -Val560Ala-varianteilla *in vitro* (Schwarz ym. 2011).

3 *SLCO1B3*-GEENIN FARMAKOGENETIIKKAA

3.1 Ei-synonyymisiä pistemutaatioita

3.1.1 Määritelmä

SLCO1B3-geenin eksoneista on löydetty useita yhden nukleotidin muutoksia/polymorfioita (single nucleotide polymorphism, SNP, pistemutaatio), joiksi luokitellaan sellaiset nukleotidimuutokset, joiden esiintyvyys populaatiossa on yli 1 % (Letschert ym. 2004; Schwarz ym. 2011; Keats ja Sherman 2013). Pistemutaatio ilmaistaan nukleotidin järjestyksnumerona ja emäksen muutoksena. Ei-synonyyminen SNP aiheuttaa aminohappomuutoksen geenistä koodattavassa proteiinissa, mikä voi muuttaa muodostuvan proteiinin toimintaa, ekspressiota ja sijaintia solussa sekä vaikuttaa edelleen yksilöiden väliseen vaihteluun endogeenisten aineiden ja lääkeaineiden farmakokinetiikassa, farmakodynamiikassa ja toksisuudessa (Yee ym. 2018).

3.1.2 Aminohappojen kemialliset ominaisuudet aminohappomuutoksissa

Aminohapot voidaan erotella sivuketjun rakenteen perusteella ja ryhmitellä muun muassa varauksen (happamuus ja emäksisyys), hydrofobisuuden (alifaattisuus ja aromaattisuus) sekä polaarisuuden mukaan (alkoholit ja amidit) (Jenkins ym. 2005). Lisäksi tietyillä ami-

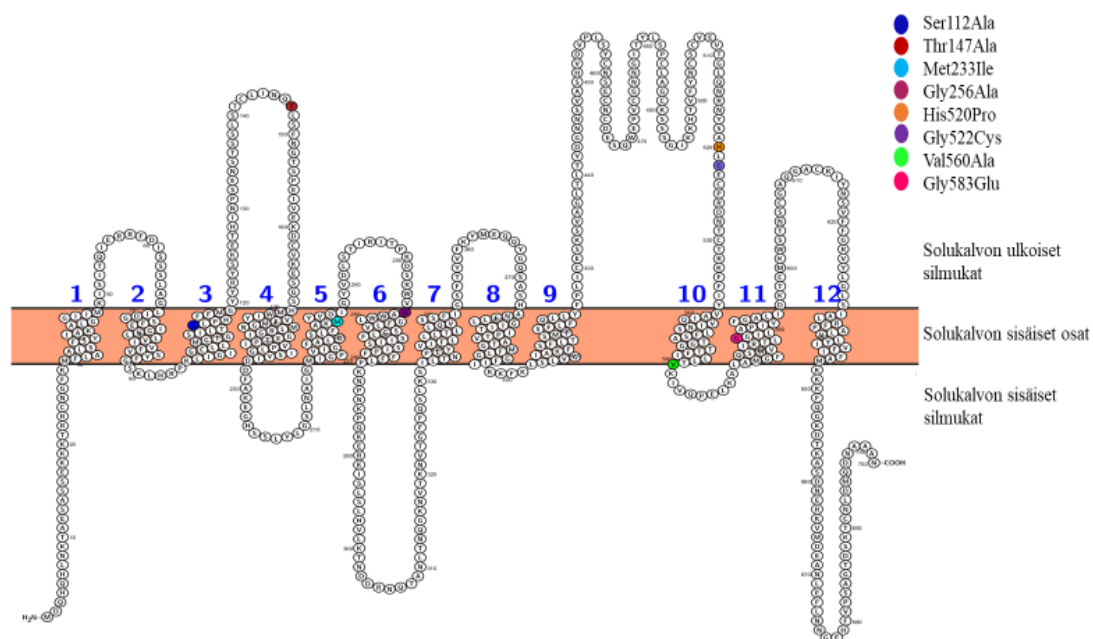
nohapoilla on erityisominaisuuksia kuten kysteiniillä on kyky muodostaa disulfidisidoksia sen sivuketjussa olevan tioli-ryhmän ansiosta. Disulfidi-sidoksilla on merkitystä proteiinin kolmiulotteisen rakenteen määräytymisessä. Aminohappomuutoksilla, joissa vaihtuneella aminohapolla on erilaiset kemialliset ominaisuudet kuin alkuperäisellä aminohapolla, voi olla vaikutusta proteiinin toimintaan (substraatin ja proteiinin vuorovaikutuksiin), kolmiulotteiseen rakenteeseen, sijaintiin tai ekspressiotasoon solussa. Esimerkiksi OATP1B3:n His520Pro-variantin solukalvo- ja kokonaisekspressio sekä kyky kuljettaa CCK8:aa ja rosuvastatiinia laski HeLa-soluissa (human cervical carcinoma, ihmisen kohdunkaulan karsinooma) aminohappomuutoksen seurauksesta, jossa villityypillä ilmenevä emäksinen aminohappo (His) muuttui alifaattiseksi (Pro) (Schwarz ym. 2011). Tästä huolimatta myös kemiallisesti samankaltaisten aminohappojen (mm. valiini ja alaniini) muutokset voivat aiheuttaa merkittäviä muutoksia proteiinin toiminnassa tai ekspressiotasossa, sillä Val560Ala-variantin CCK8 ja rosuvastatiinin kuljetus sekä proteiinin solukalvo- ja kokonaisekspressio heikkenivät merkittävästi villityypiin verrattuna HeLa-soluissa. Vaikutuksen arvioitiin aiheutuvan alaniinista puuttuvalla sivuketjulla, joka valiinilla suuntautuu kohti solukalvon keskusta ja joka olisi oleellinen proteiinin toiminnallisuuden kannalta.

3.1.3 Aminohappomuutoksen sijainnin merkitys

Aikaisempien *in vitro*-tutkimusten perusteella erityisesti aminohappomuutokset, joiden on ennustettu sijaitsevan TMD1, TMD10, TMD11, ECL3, ECL5 tai ECL6-alueilla, voivat heikentää OATP1B3-kuljetinproteiinin toimintaan (Letschert ym. 2004; Schwarz ym. 2011; DeGorter ym. 2012). DeGorter ym. (2012) tutkivat alueita, jotka ovat tärkeitä OATP1B3-spesifisen CCK8 soluunotolle muodostamalla OATP1B1-1B3 sekä OATP1B3-1B1 kimeerejä, joissa OATP1B3-aminohapposekvenssin tietyt alueet korvattiin OATP1B1-aminohapposekvenssin alueilla ja päinvastoin. Heidän mukaansa CCK8 kulkeutumiselle oleellisia aminohappoja sijaitsee TMD1:ssä, TMD10:ssä ja ECL6:ssa. He selvittivät, että OATP1B3-välitteinen CCK8 soluunotto väheni 35 %, 84 % ja 55 % keinotekoisien aminohappomuutosten Gly45Ala (TMD1:ssä), Ser545Leu (TMD10:ssä) ja Ile615Thr (ECL6:ssa) seurauksesta samalla kun Ala45Gly, Leu545Ser ja Thr615Ile

muutokset nostivat CCK8 soluunottoa vain hieman OATP1B1-välitteisesti. Lisäksi näiden kolmen aminohappomuutoksen yhtäaikainen ilmeneminen esti OATP1B3-välitteisen CCK8 soluunoton HeLa-soluissa lähes kokonaan villityyppiin verrattuna, kun taas atorvastatiinin kulkeutuminen väheni vain lievästi. Triplavariantti (Ala45Gly, Leu545Ser ja Thr615Ile) nosti CCK8 soluunottoa OATP1B1-välitteisesti vastaten noin 16 % OATP1B3-villityypin soluunotosta. OATP1B3-triplavariantin solukalvoekspressio väheni noin 40 %:iin villityypistä, mikä voi selittää sen kuljetusaktiivisuuden heikkene- mistä. Koska atorvastatiinin soluunotto heikkeni vain hieman samalla kun CCK8:n lähes kokonaan, edellä mainittujen aminohappomuutosten vaikutus soluunottoon on todennä- köisesti substraattispesifistä ja atorvastatiinin soluunoton heikentymistä selittää ainoas- taan solukalvoekspression heikentyminen.

Schwarz kumppaneineen (2011) puolestaan huomasivat, että ECL3:n Met233Ile-, ECL5:n His520Pro- ja TMD10:n Val560Ala-variantit heikensivät CCK8 ja rosuvastatiini- nin, mutta eivät atorvastatiinin soluunottoa HeLa-soluissa. Myös keinotekoinen mutaatio Gly583Glu TMD11:ssä heikensi muun muassa CCK8, DHEAS:n ja C-taun soluunottoa, mutta lisäsi E₃S:n soluunottoa (Letschert ym. 2004). Tutkimusten perusteella aminohap- pomuutosten vaikutus soluunottoon voi olla substraattispesifistä, mikä voi johtua substraattien ja proteiinin välisten vuorovaikutuskohtien eroista. Schwartz kumppanei- neen (2011) arvelivat, että pistemutaatioiden His520Pro- ja Gly522Cys-varianttien si- jainti OATP1B3-proteiinin ECL5-alueella saattavat epäsuorasti vaikuttaa alueen kys- teiini-aminohappojen välisten disulfididisidosten muodostumiseen ja johtaa siten proteiinin toiminnan heikentymiseen ja ekspressiotason laskuun. Kuvassa 6 esitetään pistemutaati- oista aiheutuvien aminohappomuutosten sijainti ennustetussa OATP1B3-kuljetinproteiini- mallissa. Erityisesti aminohappomuutokset Thr147Ala, Met233Ile ja Gly256Ala sijait- sevat tässä mallissa ECL2:ssa, TMD5:ssä ja TMD6:ssä, kun aiempien tutkimusten mal- leissa ne sijaitsivat TMD4:ssä ja muut kaksi ECL3:ssä (Letschert ym. 2004; Schwarz ym. 2011).



Kuva 6. Aminohappomuutosten ennustetut sijainnit OATP1B3-kuljetinproteiinissa. Mallin tekemisessä on hyödynnetty Protter-ohjelmaa (Omasits ym. 2014).

3.1.4 Esiintyvyys ja vaikutukset proteiiniekspressioon sekä kuljetusaktiivisuuteen

Ensimmäisinä tutkittiin kaukaasian-eurooppalaisista verinäytteistä identifioidun *SLCO1B3*-geenin ei-synonyymisten pistemutaatioiden 334T>G (Ser112Ala), 699G>A (Met233Ile) ja 1564G>T (Gly522Cys) vaikutusta OATP1B3-kuljetinproteiinin toimintaan ja ekspressioon (Letschert ym. 2004). Lisäksi tutkittiin keinotekoista pistemutaatiota 1748G>A (Gly583Glu). Myöhemmin eri etnistä alkuperää olevista DNA-näytteistä identifioidiin neljä uutta ei-synonyymistä pistemutaatiota 439A>G (Thr147Ala), 767G>C (Gly256Ala), 1559A>C (His520Pro) ja 1679T>C (Val560Ala) (Schwarz ym. 2011). Lisäksi useista populaatioista on löydetty *SLCO1B3*-haplotyyppiä *Ser112Ala_Met233Ile*, jossa pistemutaatiot 334T>G ja 699G>A ovat kytkentäepätasapainossa (Tsujiimoto ym. 2006; Smith ym. 2007; Laitinen ja Niemi 2011). Taulukossa 2 esitetään edellä mainittujen pistemutaatioiden esiintyvyyksiä eri etnisissä populaatioissa. *SLCO1B3*-geenin pistemutaatioista 334T>G ja 699G>A esiintyy laajimmin ympäri maailmaa, sillä alleelifrekvenssi on kaikissa populaatioissa yli 50 % lukuun ottamatta afrikkalaisia.

Taulukko 2. *SLCO1B3*-geenin pistemutaatioiden esiintyvyyksiä eri etnisissä ryhmissä.

SNP	Etni- nen ryhmä	Alleelifrekvenssi %					
		Lähde					
		A (N)	B (N)	C(N)	D (N)	E	F (N)
334T>G Ser112Ala rs4149117	GLO	70(5008)	80(121358)	-	-	-	-
	AAS	-	84(25162)	-	62(46)	-	-
	AFR	36(1322)	44(10400)	-	39(44)	-	-
	AME	84(694)	79(11578)	-	-	-	-
	EUR	87(1006)	84(73310)	78(182)	52(44)	-	-
	FIN	-	-	-	-	-	77(552)
439A>G (Thr147Ala) rs57585902	GLO	1.1(5008)	0.3(119048)	-	-	-	-
	AAS	-	0(24874)	-	0(46)	-	-
	AFR	4.0(1322)	3.5(9686)	-	1.1(46)	-	-
	AME	0(694)	0.1(11444)	-	-	-	-
	EUR	0(1006)	0(72158)	-	0(45)	-	-
	FIN	-	-	-	-	-	-
699G>A Met233Ile rs7311358	GLO	70(5008)	80(121360)	-	-	-	-
	AAS	-	84(25156)	-	80(44)	-	-
	AFR	36(1322)	44(10402)	-	48(46)	-	-
	AME	84(694)	79(11576)	-	-	-	-
	EUR	87(1006)	84(73318)	71(182)	78(43)	-	-
	FIN	-	-	-	-	-	77(552)
767G>C Gly256Ala rs60140950	GLO	6.6(5008)	11(121408)	-	-	-	-
	AAS	-	4.6(25166)	-	0(46)	-	-
	AFR	0.8(1322)	2.6(10406)	-	3.3(46)	-	-
	AME	11(694)	6.3(11578)	-	-	-	-
	EUR	17(1006)	16(73350)	-	18(45)	-	-
	FIN	-	-	-	-	-	13(552)
1559A>C (His520Pro)	AAS	-	-	-	0.6(82)	-	-
	AFR	-	-	-	0(69)	-	-
	EUR	-	-	-	0(87)	-	-
1564G>T (Gly522Cys) rs72559743	EUR	-	-	1.9(182)	-	-	-
1679T>C (Val560Ala) rs12299012	GLO	0.6(5008)	0.2(121238)	-	-	-	-
	AAS	-	0(25148)	-	0(82)	-	-
	AFR	2.2(1322)	2.5(10378)	-	3.6(69)	-	-
	AMEt	0(694)	0.05(11534)	-	-	-	-
	EUR	0(1006)	0(73270)	-	0(87)	-	-
334T>G _699G>A (Ser112Ala _Met233Ile)	EUR ^a	-	-	-	-	80	-
	AME ^b	-	-	-	-	88	-
	AFA	-	-	-	-	41	-
	MEX	-	-	-	-	79	-
	HAN	-	-	-	-	76	-
	GHA	-	-	-	-	37	-

A) 1000Genomes:n tiedot saatu ncbi-tietokannasta (Sherry ym. 2001). B) ExAC:n (The Exome Aggregation Consortium) tiedot saatu ncbi-tietokannasta (Sherry ym. 2001). C) Letschert ym. 2004. D) Schwarz ym. 2011. E) Smith ym. 2007. F) Laitinen ja Niemi 2011. N, otoskoko. a syöpäpotilaita, b terveitä vapaaehtoisia. GLO:globaali, AAS:aasialaiset, AFR:afrikkalaiset, AME:amerikkalaiset, AFA:afrikan-amerikkalaiset, MEX: meksikolaiset, HAN: han-kiinalaiset, GHA: ghanalaiset EUR: eurooppalaiset, FIN: suomalaiset.

Edellä mainittujen pistemutaatioiden on tutkittu vaikuttavan OATP1B3-kuljetinproteiinin määrään ja/tai toimintaan *in vitro* (Letschert ym. 2004; Schwarz ym. 2011). Varianttien Gly522Cys ja Gly583Glu sekä His520Pro ja Val560Ala määrä MDCKII- (Madin–Darby canine kidney) ja HeLa-solujen solukalvolla oli heikentynyt OATP1B3-villityypin nähden. Lisäksi aminohappomuutokset Gly522Cys ja Gly583Glu vähensivät hieman OATP1B3-proteiinimäärää solukalvolla HEK293-soluissa (Letschert ym. 2004). Syyksi eroavaisuuksiin eri solutyypin välillä epäiltiin Gly522Cys ja Gly583Glu aminohappomuutoksista aiheutuvia muutoksia proteiinin glykosylaatioon MDCKII-soluissa. Samanlaista vaikutusta glykosylaatioon ei havaittu kuitenkaan HEK293-soluissa. Lisäksi Gly256Ala, His520Pro ja Val560Ala varianttien kokonaismäärä HeLa-soluissa väheni OATP1B3-villityypin verrattuna (Schwarz ym. 2011). Ser112Ala- sekä Thr147Ala-varianttien kokonaismäärä HeLa-soluissa puolestaan kasvoi hieman verrattuna OATP1B3-villityypin. Met233Ile-variantin määrässä solukalvolla ja kokosolussa ei havaittu muutoksia villityypin verrattuna MDCKII-, HEK293-soluissa eikä HeLa-soluissa (Letschert ym. 2004; Schwarz ym. 2011).

OATP1B3-kuljetinproteiinin toimintaa *in vitro* ovat heikentäneet erityisesti variantit His520Pro, Gly522Cys, Val560Ala ja Gly583Glu (Letschert ym. 2004; Schwarz ym. 2011). Esimerkiksi BSP:n, CCK8, C-taun ja DHEAS:n kulkeutuminen Gly522Cys- ja Gly583Glu-välitteisesti heikentyi OATP1B3-villityypin verrattuna MDCKII- ja HEK293-soluissa (Letschert ym. 2004) His520Pro- ja Val560Ala-välitteinen CCK8 soluunotto heikentyi kumpikin noin 80 % ja rosuvastatiinin 55 % ja 46 % villityypistä HeLa-soluissa (Schwarz ym. 2011). Met233Ile-välitteinen CCK8 ja rosuvastatiinin soluunotto heikentyi 35 % ja 44 % villityypistä HeLa-soluissa, mutta heikkenemistä BSP:n, CCK8:n, DHEAS:n, C-taun, E₃S:n ja E₂17βG:n soluunotoissa ei havaittu MDCKII- eikä HEK293-soluissa (Letschert ym. 2004; Schwarz ym. 2011). Atorvastatiinin soluunotto Met233Ile-, His520Pro- ja Val560Ala-varianttien välityksellä ei eronnut villityypistä (Schwarz ym. 2011). Sitä vastoin Ser112Ala-välitteinen soluunotto lisääntyi CCK8:lla, DHEAS:lla, E₃S:lla ja C-tau:lla MDCKII-soluissa, mutta HeLa-soluissa CCK8 soluunotto ei merkittävästi eronnut villityypistä (Letschert ym. 2004; Schwarz ym. 2011). Lisäksi verrattuna villityypin Ser112Ala_Met233Ile haplotyyppiin on osoitettu heikentävän

CCK8 soluunottoa HeLa-soluissa, testosteronin soluunottoa Cos-7-soluissa sekä MPAG:n soluunottoa HEK293-soluissa (Hamada ym. 2008; Picard ym. 2010; Schwarz ym. 2011). Puolestaan CCK8 soluunotto Gly256Ala- tai Thr147Ala-variantin välityksellä oli verrattavissa OATP1B3-villityyppiin HeLa-soluissa (Schwarz ym. 2011). Taulukossa 3 esitetään tiivistetysti OATP1B3-varianttien aiheuttamat muutokset CCK8 ja BSP:n *in vitro* farmakokinetiikassa sekä kokonais- ja solukalvoekspressiossa.

Taulukko 3. Pistemutaatioiden aiheuttamat muutokset CCK8:n ja BSP:n *in vitro* farmakokinetiikassa sekä OATP1B3-kuljetinproteiinin kokonais- ja solukalvoekspressiossa.

SNP (aminohappomuutos)	Substraatti	K _m (μM)	V _{max} (pmol/ mg prot/min)	Kokonais- ekspressio	Kalvo- ekspressio
334T>G (Ser112Ala)	CCK8 BSP	2.8~ ^a 9.1↑ ^b	44~ ^a 189↑ ^b	↑ ^a -	~ ^a ~ ^b
439A>G (Thr147Ala)	-	-	-	↑ ^a	~ ^a
699G>A (Met233Ile)	CCK8 BSP	7.3~ ^a 12.3↑ ^b	28↓ ^a 180↑ ^b	~ ^a -	~ ^a ~ ^b
767G>C (Gly256Ala)	-	-	-	↓ ^a	~ ^a
1559A>C (His520Pro)	CCK8	3.1~ ^a	7.3↓ ^a	↓ ^a	↓ ^a
1564G>T (Gly522Cys)	BSP	9.1~ ^b	25.5↓ ^b	-	↓/~ ^b
1679T>C (Val560Ala)	CCK8	8.0~ ^a	8.2↓ ^a	↓ ^a	↓ ^a
1748G>A (Gly583Glu)	BSB	6.3~ ^b	37.8↓ ^b	-	↓/~ ^b
334T>G ja 699G>A (Ser112Ala_Met233Ile)	CCK8	7.3~ ^a	39~ ^a	-	-

^a Schwarz ym. 2011, ^b Letschert ym. 2004. Merkinnät ~, ↑ ja ↓ tarkoittavat ei muutosta, lisäys tai väheneminen villityyppiin verrattuna.

3.2 Kopolukumuutos

Kopolukumuutos eli CNV (copy-number variation) määritellään DNA-jakson monistumana tai poistumana (deleetiona), joka vaihtelee usein 1 kb-3 Mb välillä (Santos ym. 2018). Myös koko geeni on voinut monistua yksilön genomissa. Genomisessa CNV:ssä, Downin syndroomassa, puolestaan kokonainen kromosomi 21 tai sen osa on monistunut

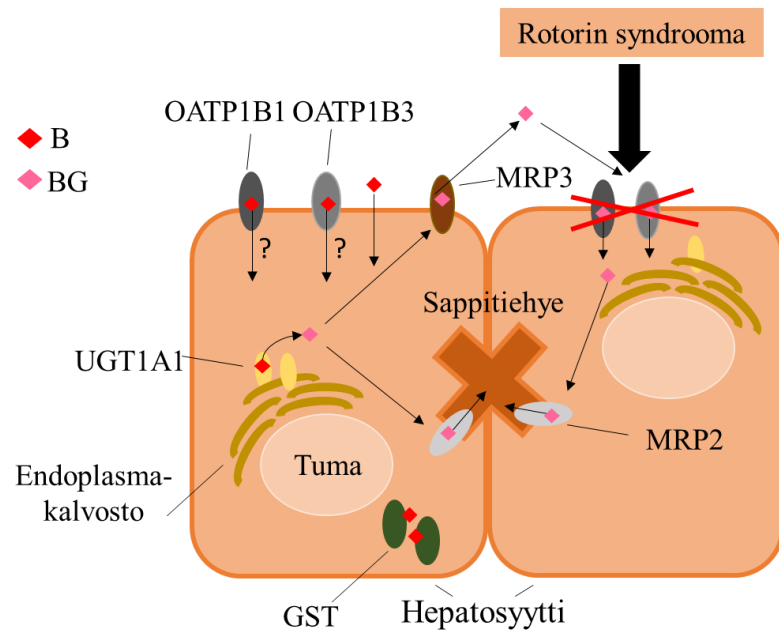
(Lupski 2007). Kopolukumuutokset voivat muuttaa geenin toiminnallisuutta joko lisäämällä tai kumoamalla sitä ja edelleen vaikuttaa sairastumisalttiuteen sekä geneettiseen vaihteluun yksilöiden ja eri etnisten ryhmien välillä lääkeaineiden farmakokinetiikassa ja lääkevasteissa (Lupski 2007; Santos ym. 2018). *SLCO1B3*-geenin CNV:stä on toistaiseksi vain vähän tietoa. Santos työryhmineen (2018) kuitenkin arvioi, että tutkimuksessa esitetyt uudet *SLCO1B3*-geenin CNV:t aiheuttavat alleelin toimimattomuuden (LOF, loss of function) 17 %:lla ei-suomalaisista eurooppalaisista. Heidän mukaansa erityisesti espanjalaisilla ja ei-suomalaisilla eurooppalaisilla esiintyy *SLCO1B3*-geenin CNV:tä (MAF, minor allelic frequency, 2. yleisimmän alleelin esiintymistiheys = 0.53 %, n=1080 ja 0.1 %), josta eksonit 9-13 ovat hävinneet.

3.3 Rotorin syndrooma

Rotorin syndrooma (RS) on harvinainen resessiivisesti autosomaalisesti periytyvä hyväennusteinen hyperbilirubinemiaa aiheuttava oireyhtymä (Roy-Chowdhury ja Roy-Chowdhury 2012; van de Steeg ym. 2012). Siinä konjugoitunut (glukuronoitunut) bilirubiini kertyy vereen, mikä voi ilmetä ihmisellä esimerkiksi ihon keltaisuutena pian syntymän jälkeen tai lapsuus vuosien aikana. Bilirubiinia syntyy muun muassa punasolujen hemoglobiiniproteiinin hemi-ryhmän hajoamistuotteena ja se on verenkierrossa sitoutuneena ensisijaisesti albumiiniin (Roy-Chowdhury ja Roy-Chowdhury 2012). Rotorin syndrooman aiheuttajaksi on esitetty maksan OATP1B1- ja OATP1B3-kuljetinproteiinien geneettisistä syistä johtuvaa toimimattomuutta (van de Steeg ym. 2012). Kyseisten kuljetinproteiinien tehtävänä on kuljettaa konjugoitunut ja mahdollisesti myös ei-konjugoitunut bilirubiini hepatosyytteihin (Cui ym. 2001; Sanna ym. 2009; van de Steeg ym. 2012). Konjugoimaton bilirubiini voi myös passiivisesti diffundoitua hepatosyytteihin sen rasvaliukoisen rakenteen vuoksi (Erlinger ym. 2014).

Hepatosyyteissä UGT1A1-entsyymi (uridiinidifosfoglukuronaatti–glukuronosyyli transferaasi 1A1) muuttaa bilirubiinin helpommin erittyväksi vesiliukoiseksi metaboliitiksi, glukuronidiksi, konjugoimalla siihen glukuronihapon, jonka jälkeen se voi erittyä joko

MRP2-välitteisesti (multidrug resistance-associated protein 2) sapen mukana tai kulkeutua takaisin vereen maksan basolateraalikalvon MRP3- ja MRP1-kuljetinproteiinien välityksellä (Roy-Chowdhury ja Roy-Chowdhury 2012). Lisäksi bilirubiinia voidaan varastoida hepatosyyteissä sitomalla se sytosoliin proteiineihin kuten GST-proteiineihin (Glutathioni-S-transferaaseihin/Y-proteiineihin), jolla voi olla vaikutusta bilirubiinin akkumulaatiossa hepatosyytteihin ja vähentyneessä effluksissa (Erlinger ym. 2014). Kuva 7 havainnollistetaan bilirubiinin maksametaboliaa sekä Rotorin syndrooman taustaa.



Kuva 7. Bilirubiinin metaboliaan ja erittymiseen osallistuvat proteiinit maksassa sekä Rotorin syndrooman kehittymisen taustalla olevien kuljetinproteiinien tehtävät. B:llä tarkoitetaan konjugoimatonta bilirubiinia ja BG:llä bilirubiiniglukuronidi-metaboliitteja.

Van de Steeg kumppaneineen (2012) osoittivat, että mutaatiot, jotka aiheuttavat *SLCO1B1*- sekä *SLCO1B3*-geenien kummankin alleelin toiminnan menetyksen, voivat johtaa Rotorin syndrooman kehittymiseen. He vertasivat Oatp1a/1b-puutteellisten hiirten plasman bilirubiinikonjugaattipitoisuuksia villityypin hiiriin ja huomasivat bilirubiinimonoglukuronidi- (BMG) sekä bilirubiinidiglukuronidi- (BDG) pitoisuuksien nousseen merkittävästi Oatp1a/1b-puutteellisilla hiirillä. He myös selvittivät, että ihmisen OATP1B1:tä tai OATP1B3:ta ekspressoivissa transgeenisissä Oatp1a/1b-puutteellisissa

hiirissä plasman BMG ja BDG pitoisuudet palautuivat villityypin hiirten tasolle. Hiirillä maksan Oatp1a- ja Oatp1b-kuljetinproteiinien puute on havaittu aiheuttavan konjugoitunutta hyperbilirubinemiaa (van de Steeg ym. 2010). Lisäksi RS:n syitä on tutkittu myös ihmisillä (van de Steeg ym. 2012). Tutkimukseen valikoitui kahdeksan perhettä, joissa 11 koehenkilöllä ilmeni RS:aa. Sekvensointianalyysin perusteella tutkijat esittivät kolme RS:n mahdollisesti aiheuttavaa haplotyyppiä R1, R2 ja R3, jotka voivat johtaa OATP1B1- ja OATP1B3-proteiinien ekspression sekä toiminnan häiriintymiseen tai tuhoutumiseen ja joita ilmeni tutkittavissa perheissä (Taulukko 4). RS ilmeni vain yksilöillä, jotka olivat homotsygootteja mutatoituneiden alleelien suhteen. Yhdellä tutkittavalla henkilöllä, joka oli heterotsygootti *SLCO1B1*-1738C>T pistemutaation suhteen mutta homotsygootti *SLCO1B3*-geenin eksonin 12 deleetion suhteen, ei ilmennyt keltaisuutta. Tutkijoiden mukaan yksikin toimiva alleeli *SLCO1B1*- tai *SLCO1B3*-geeneissä voisi ehkäistä RS:n kehittymistä ihmisillä.

Taulukko 4. Rotorin syndrooman mahdollisesti aiheuttavia mutaatioita *SLCO1B1*- ja *SLCO1B3*-geeneissä sekä niiden vaikutukset muodostuvaan proteiiniin.

Haplotyyppi	<i>SLCO1B1</i> -geenin mutaatio ¹	<i>SLCO1B3</i> -geenin mutaatio ²	Ennustettu seuraus proteiinin rakenteessa
R1	1738C>T	Eksonin 12 deleetio (7200 emäsparia)	¹⁾ 1,5 transmembraanista osaa puuttuu C-terminaalisesta alueesta. ²⁾ 3 transmembraanista osaa puuttuu C-terminaalisesta alueesta.
R2	Koko geenin deleetio	Eksonien 3-15 deleetio (405 000 emäsparia)	¹⁾ Proteiinia ei muodostu lainkaan. ²⁾ Vain pieni osa N-terminaalisesta alueesta voi muodostua.
R3	757C>T	Silmukointikohdan mutaatio 1747+1G>A	¹⁾ Proteiinin ”katkeaminen” ennen 7. transmembraanista osaa. ²⁾ 1,5 transmembraanista osaa puuttuu C-terminaalisesta alueesta.

Rotorin oireyhtymän aiheuttavista mutaatioista tiedetään toistaiseksi vielä vähän. Tutkimuksien perusteella OATP1B1- ja OATP1B3-kuljetinproteiinien toiminta vaikuttaa kuitenkin olevan kriittistä konjugoidun bilirubiinin metaboliassa, ja puutteet niiden toiminnassa selittävät RS:n syntyä. Lisäksi, vaikka RS on hyväennusteinen oireyhtymä, ongelmia saattaa esiintyä RS-potilaiden lääkehoidoissa, koska jo ainoastaan OATP1B1-kuljetinproteiinin heikentynyt toiminta on johtanut lääketoksisuus riskin kasvuun (Pasanen ym. 2006). van de Steeg kumppaneineen (2012) esittivätkin, että RS-diagnoosin tulisi ohjata lääkäreitä OATP1B1- ja OATP1B3-spesifisten lääkeaineiden annostelussa.

4 TUTKIMUKSEN TAUSTA JA TAVOITTEET

OATP1B1- ja OATP1B3-kuljetinproteiinien geneettisistä syistä johtuva toimimattomuus on yhdistetty ihmisillä esiintyvään Rotorin oireyhtymään (van de Steeg ym. 2012). Näiden kuljetinproteiinien inhibitiolla on myös tutkittu olevan kliinistä merkitystä lääkeainealtistuksien kasvussa sekä lääkeainetoksisuuksissa (Seithel ym. 2007; Hougaard Christensen ym. 2019). Siten myös geneettisen variaation aiheuttamat muutokset näiden kuljetinproteiinien toiminnassa voivat vaikuttaa niiden substraattien farmakokinetiikkaan, farmakodynamiikkaan ja toksisuuteen. *In vitro*-tutkimustietoa *SLCO1B3*-geenissä esiintyvien pistemutaatioiden vaikutuksista OATP1B3-proteiinin toimintaan ja ekspresioon löytyy vain rajallisesti. Tässä tutkimuksessa vahvistettiin aiempaa tutkimustietoa tunnettujen *SLCO1B3*-geenissä esiintyvien pistemutaatioiden 334T>G, 699G>A ja 767G>C vaikutuksista OATP1B3-kuljetinproteiinin toimintaan HEK293-soluissa. Lisäksi selvitettiin keinotekoisien WTP-varianttien vaikutukset OATP1B3-kuljetinproteiinin toimintaan. Tutkimuksessa käytettiin bakulovirusekspressiomenetelmää, jota ei ole aiemmin hyödynnetty rekombinantti-OATP1B3-kuljetinproteiinin tuottamisessa. Pistemutaatiot 334T>G ja 699G>A valikoituivat tutkimukseen, sillä niiden alleelifrekvenssi useissa populaatioissa on yli 50 % ja niiden vaikutuksista kuljetinproteiinin toimintaan ei olla täysin yksimielisiä (Letschert ym. 2004; Schwarz ym. 2011). Pistemutaatio 767G>C puolestaan valikoitui tutkimukseen, sillä aiemman tutkimuksen perusteella sen toiminta ei

ollut heikentynyt merkitsevästi, vaikka sen kokonaisekspressio HeLa-soluissa oli laskenut (Schwarz ym. 2011).

Pro gradu -tutkielman tavoitteina oli:

1. Pystyttää ja optimoida OATP1B3-kuljetinproteiinin toiminnan tutkimiseen käytettävä *in vitro*-menetelmä.
2. Ilmentää bakulovirusekspressiomenetelmää hyödyntäen OATP1B3-villityyppejä ja variantteja ohimenevästi HEK293-soluissa.
3. Selvittää valittujen pistemutaatioiden sekä keinotekoisien varianttien vaikutukset OATP1B3-kuljetinproteiinin kuljetusaktiivisuuteen ja ekspressioon.

5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

5.1 Materiaalit

SLCO1B3-geeni ostettiin pENTR223-1 kloonausvektorissa *E. coli* soluissa Genomics-online.com:lta (Aachen, Saksa). Plasmidien puhdistukseen käytettiin NucleoSpin Plasmid EasyPure -protokollaa, joka ostettiin Macherey-Nagel:lta (Dueren, Saksa). Q5 Site-Directed Mutagenesis -protokollaa käytettiin kohdennetussa mutageneesissä ja materiaalit siihen ostettiin New England Biolabs Inc:ltä (Ipswich, MA, Yhdysvallat). Alukkeet ostettiin Metabion international:lta (Planegg, Saksa). Fluoresoivat substraatit natriumfluoreseiini (NaFluo) ja 8-(2-[fluoreseiinyli]aminoetyylitio) adenosiini-3',5'-syklinen monofosfaatti (8-[Fluo]-cAMP, 8-FcA) ostettiin Sigma-Aldrich:lta (Saint Louis, MO, Yhdysvallat) ja BIOLOG:lta (Bremen, Saksa). Primääri vasta-aineina käytettiin Anti-OATP2/8 (MDQ) hiiren monoklonaalista vasta-ainetta, joka ostettiin Novus Biologicals:lta (NB100-74482, Centennial, CO, Yhdysvallat) ja Anti-BCRP hiiren monoklonaalista vasta-ainetta, joka ostettiin Abcam:lta (ab3380, Cambridge, Iso-Britannia). Goat Anti-Mouse IgG-HRP sekundääri vasta-aine ostettiin ThermoFisher Scientific:ltä (62-6520, MA, Yhdysvallat).

5.2 Kohdennettu mutageneesi

Kohdennettua mutageneesia (Q5 Site-Directed Mutagenesis), joka hyödyntää polymeraasiketjureaktioita (polymerase chain reaction, PCR) mutaatioiden toteuttamisessa, käytettiin lopetuskodonin lisäämiseksi sekä pistemutaatioiden 334T>G, 699G>A ja 767G>C toteuttamiseksi *SLCO1B3*-geeniin. TAA-lopetuskodonin sisältävän alukkeen sekä pistemutaatioalukkeiden sekvenssit on esitetty Taulukossa 5. Kohdennettu mutageneesi -menetelmä perustuu Q5 Hot Start High-Fidelity DNA polymeraasiin, jonka avulla alukkeen sisältämä substituuutio ja lisäys voidaan tehdä *SLCO1B3*-geeniin PCR:n aikana. PCR:n jälkeen seokseen, joka sisältää monistettua *SLCO1B3*-geeniä, lisätään kinaasi-ligaasi-DpnI-entsyymiseosta DNA-juosteiden plasmidirakenteen uudelleen luomiseksi. Ennen pistemutaatioiden toteuttamista *SLCO1B3*-geeni pENTR223-1-plasmidissa sekvensoitiin (Eurofins Genomics, Saksa) ja sekvensointitulokset analysoitiin Benchling -ohjelmaa (Wickramasekara ym. 2012) hyödyntäen, jotta voitiin varmistua geenin oikeasta sekvenssistä. Pistemutaatioiden onnistuminen varmistettiin sekvensoimalla mutatoitunut *SLCO1B3*-geeni.

Taulukko 5. Alukkeet kohdennettuun mutageneesiin.

Aluke	Sekvenssi	
	Etenevä (forward)	Käänteinen (reverse)
<i>SLCO1B3</i> lopetuskodoni	5'- <u>TAA</u> TCAGGCCTCATGGGCCCA-3'	5'-GTTGGCAGCAGCATTGTCTTGC-3'
<i>SLCO1B3</i>-334T>G	5'-TATTTTGACAG <u>G</u> CTTTACCA-CATTTC-3'	5'-CTTCCAGTTCCCATAAGG-3'
<i>SLCO1B3</i>-699G>A	5'-TTGCTAAAAT <u>A</u> TACGTGGA-TATTGG-3'	5'-ACAGAGATCCCAGTGCAA-3'
<i>SLCO1B3</i>-767G>C	5'-CGTTGGGTTG <u>C</u> AGCTTGGTGG-3'	5'-AGAGTCCTTAGGAGTTATTCTGATAG-3'

5.3 Soluviljely

Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) -hyönteissoluja käytettiin bakulovirusvarastoliuosten valmistuksessa. P3-bakuloviruksilla transduktoitiin HEK293-solut, joissa OTP1B3-kuljetinproteiinia oli tarkoitus ekspressoida. Kumpiakin soluja kasvatettiin adherentteina soluviljelminä soluviljelypulloissa (Sarstedt). Sf9-hyönteissoluja kasvatettiin 27 °C:ssa 5 %:sti naudan sikiön seerumilla (fetal bovine serum, FBS) supplementoidussa HyClone SfX-Insect -mediumissa (ThermoFisher Scientific). Hyönteissolut jatkoviljeltiin 1-2 kertaa viikossa niiden ollessa noin 90-95 %:sti konfluentteja. HEK293-soluja kasvatettiin puolestaan 10 %:sti FBS:llä supplementoidussa korkea glukoosisessa GlutaMax Dulbecco's Modified Eagle Mediumissa (DMEM) (Gibco, ThermoFisher Scientific) 37 °C:ssa ja 5 %:ssa CO₂:ssa. Noin 90-95 %:sti konfluentit solut jatkoviljeltiin noin 2 kertaa viikossa. Kuljetusaktiivisuutta määrittävät solukokeet tehtiin tuoreilla, hiljattain -80 °C:sta sulatetuilla HEK293-soluilla.

5.4 Bac-to-bac bakulovirusekspressiomenetelmä

OATP1B3-villityypin sekä varianttien tuottamisessa käytettiin muokattua Bac-to-bac bakulovirusekspressiomenetelmää (Invitrogen, ThermoFisher Scientific). Ensimmäisessä vaiheessa *SLCO1B3*-geeni pENTR223-1-plasmidissa tarkoitukseen soveltuvassa *E. coli* -kannassa viljeltiin spektinomysiini (100µg/ml) selektiiviselle LB-agar elatusmaljalle. Plasmidin puhdistuksen jälkeen *SLCO1B3*-geeni pENTR223-1-plasmidista kloonattiin Gateway-kloonaus menetelmää hyödyntäen vastaanottavaan BacMam-plasmidiin LR Clonase II Enzyme Mix:in (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) avulla. LR-reaktion jälkeen *SLCO1B3*-geeni BacMam-plasmidissa transformoitiin NEB 5-alpha kompetentteihin *E. coli* -soluihin, joista tehtiin ampisilliini (100µg/ml) selektiiviselle LB-agar elatusmaljalle viljelmä. BacMam-plasmidi sisälsi ampisilliini resistenssigeenin. Ampisilliini sekä reagoimattoman BacMam-plasmidin *ccdB*-geeni varmistivat pENTR223-1-plasmidin sekä pelkän BacMam-plasmidin sisältävien *E. coli* -solujen kuoleman. Plasmidien puhdistukseen käytettiin NucleoSpin Plasmid EasyPure -menetelmää. *SLCO1B3*-geenin

siirtymisen varmistamiseksi suoritettiin restriktioanalyysi, jossa käytettiin *ApaI*-restriktioentsyymiä katkaisemaan *BacMam-SLCO1B3*-plasmidi kahdesta kohtaa siten, että saatiin muodostettua noin 7000 ja 4000 emäsparin DNA-fragmentit. Agaroosigeelielektroforeesia hyödynnettiin näytteiden DNA-fragmenttien erottelamiseen ja geeli analysoitiin ChemiDoc XRS+ kuvantamislaitteella (BioRad Laboratories Inc.)

Seuraavassa vaiheessa *BacMam-SLCO1B3*-plasmidi transformoitiin kompetentteihin DH10Bac *E. coli* -soluihin (Gibco, ThermoFisher Scientific), jotka sisälsivät bakmidi-DNA:ta. Tarkoituksena oli saada aikaan *SLCO1B3*-geenin transpositio bakmidi-DNA:han. DH10Bac *E. coli* -solut sisälsivät auttajaplasmidin, jossa oli transposaasi-entsyymiä koodaava geenisekvenssi. Transposaasia tarvitaan geenin transpositiossa bakmidiin. DH10Bac *E. coli* -solut siirrettiin transformaation jälkeen bakmidi-elatusmaljalle, joka sisälsi LB-agaria, antibioottiselektiotekijöinä kanamysiiniä (50 µg/ml), gentamisiiniä (7µg/ml) ja tetrasykliiniä (10µg/ml) sekä X-gal:ia (5-bromi-4-kloori-3-indolyyli-β-D-galaktosidi; 100µg/ml) ja IPTG (isopropyli β-D-1-tiogalaktopyranosidi; 40µg/ml) *LacZ*-selektiota varten. Kahden vuorokauden inkuboinnin jälkeen 37°C:ssa valkoiset pesäkkeet, joissa *SLCO1B3*-geeni oli transposoitunut *LacZ*-geenin keskelle, olivat kerättävissä. Muutama valkoinen pesäke siirrostettiin uusille bakmidi-levyille, jotta voitiin varmistua bakteerien fenotyypistä. Rekombinantti-bakmidi-DNA puhdistettiin DH10Bac *E. coli* -nestekasvatusliuoksesta Bac-to-Bac -protokollan (vanha versio; Invitrogen, ThermoFisher Scientific) mukaisesti. Bakmidi sisältää lisäksi bakulovirusten valmistamiseen tarvittavan geneettisen informaation.

SLCO1B3-bakmidi-DNA:n PCR:llä varmistettiin, että geenin transpositio bakmidiin oli onnistunut. Alukkeet PCR:ään valittiin siten, että ne sitoutuivat bakmidin mini-*attTn7* -alueen reunoille (Bacmid F+Bacmid R), jolloin näytteiden tuli sisältää koko geeni sekä hieman bakmidia (Taulukko 6). Lisäksi toiseen reaktioon valittiin alukkeet, jotka sitoutuivat geeniin ja mini-*attTn7*-alueen toiseen reunaan (R4+Bacmid F). Agaroosigeelielektroforeesia käytettiin PCR-tuotteiden DNA-palojen erotukseen ja lopuksi ne analysoitiin ChemiDoc XRS+ kuvantamislaitteella.

Taulukko 6. Alukkeet rekombinantti-bakmidi-DNA:n PCR:ään.

Aluke	Sekvenssi
pUC/M13 Forward (Bacmid F)	5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'
pUC/M13 Reverse (Bacmid R)	5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3'
<i>SLCO1B3</i> Reverse 4 (R4)	5'-TCCAGTTCCCATAAGGAGACA-3'

Rekombinantti-bakulovirusia tuotettiin transfektoimalla puhdistettua rekombinantti-bakmidi-DNA:ta Sf9-hyönteissoluihin. Ennen transfektiota 4ml Sf9-hyönteissoluja pelkässä mediumissa (0.625×10^6 solua/ml) istutettiin T25-soluviljelypulloon ja solujen annettiin kiinnittyä 1 tunnin ajan 27°C:ssa. Transfektioseoksia, jotka sisälsivät Cellfectin II reagenssia (Gibco, ThermoFisher Scientific), rekombinantti-bakmidi-DNA:ta ja mediaa ilman FBS:ää inkuboitettiin soluviiljelypullossa 27°C:ssa 5 tuntia, jonka jälkeen ne korvattiin 5 %:lla FBS-suplementoidulla mediumilla (Taulukko 7). P1-virusliuos kerättiin, kun transfektoituja Sf9-soluja oli inkuboitu 27°C:ssa 7 vuorokautta. Bakulovirustiiteriä vahvistettiin vielä kahdesti infektoimalla uudet Sf9-solut kerätyillä virusliuoksilla ja inkuboimalla niitä 27°C:ssa 7 vuorokautta. P3-virusliuosta käytettiin HEK293-solujen transduktioon.

Taulukko 7. Sf9-hyönteissolujen transfektiossa käytetyt DNA-määrät.

Variantti / villityyppi	Määrä (µg)
<i>SLCO1B3</i> villityyppi	7,67
<i>SLCO1B3</i>-334T>G	9,03
<i>SLCO1B3</i>-699G>A	8,89
<i>SLCO1B3</i>-767G>C	8,77
<i>SLCO1B3</i> WTP	2,86

5.5 Kuljetusaktiivisuuden määrittäminen

Noin 90-95 %:sti konfluentit HEK293-solut istutettiin 24- tai 48-kuoppalevyille (Corning, Yhdysvallat), joissa solutiheydet olivat 100 000 solua/kuoppa ja 50 000 solua/kuoppa. Ennen transduktiota soluja inkuboitiin 37 °C:ssa ja 5 %:ssa CO₂:ssa 24 tuntia solujen kiinnittymisen varmistamiseksi. Transduktiota varten valmistettiin seos, joka sisälsi rekombinantti-virusliuosta, 5 mM natriumbutyraattia ja 10 %:sti FBS:llä supplementoitua mediumia. Seosta inkuboitiin soluilla 37 °C:ssa ja 5 %:ssa CO₂:ssa 48 tuntia ennen kuljetusaktiivisuuskokeita. Keltaisen fluoresoivan proteiinin (enhanced yellow fluorescence protein, eYFP) geeniä kantavia bakulovirusia käytettiin transfektiokontrollina. Solukokeissa eYFP-kontrolli kertoo passiivisen kulkeutumisen osuuden.

OATP1B3-proteiinin tutkimiseen käytettävän koeasetelman optimoimiseksi määritettiin fluoresoivien substraattien, NaFluo:n ja 8-FcA:n, testiaika sekä testipitoisuus. Lisäksi työssä optimoitiin transduktioon käytettävä virusmäärä. Testattavat virusmäärät 24-kuoppalevyllä olivat 30 µl, 45 µl, 60 µl, 75µl per kuoppa. Optimoitavat parametrit sekä formaatti aikalineaarisuuskokeisiin, pitoisuudenmäärittyskokeisiin sekä virusmäärän optimointikokeeseen on esitetty Taulukoissa 8 ja 9.

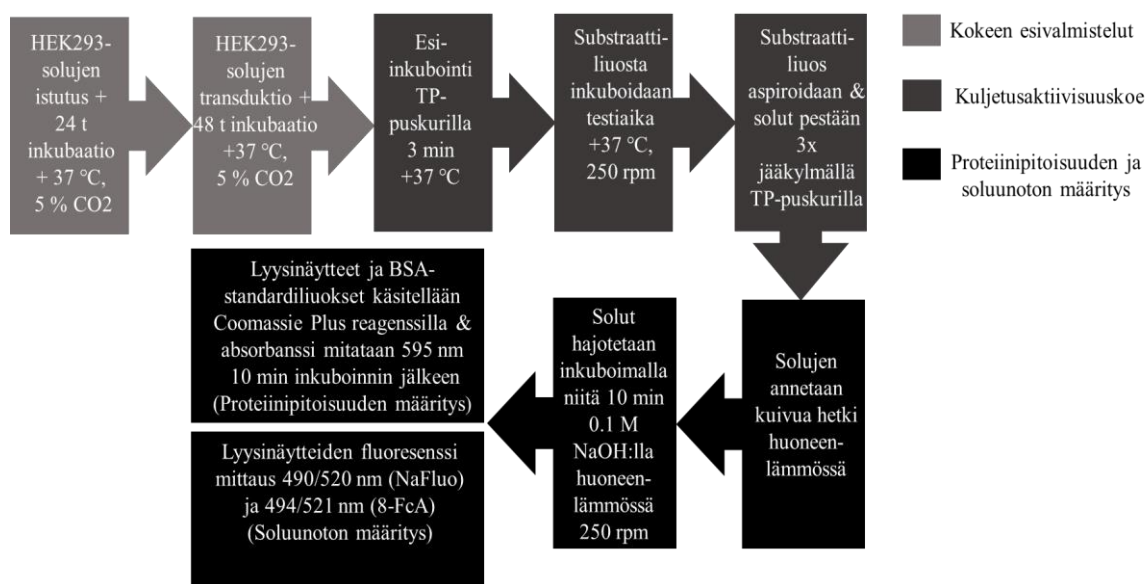
Taulukko 8. Koeasetelman optimointiin liittyvät parametrit (8-FcA).

Parametri / formaatti	Aikalineari- suuskoe	Pitoisuuden opti- mointikoe	Virusmäärän op- timointikoe
Formaatti	24-kuoppalevy	48-kuoppalevy	24-kuoppalevy
Virusmäärä	30 µl	30 µl	30 µl, 45 µl, 60 µl, 75µl
Substraattipitoisuus (8-FcA)	2,5 µM	1 µM, 1,5 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM	2,5 µM
Substraatin inkubaa- tioaika	1 min, 5 min, 10 min, 15 min	5 min	3 min

Taulukko 9. Koeasetelman optimointiin liittyvät parametrit (NaFluo).

Parametri / formaatti	Aikalinearisuuskoe	Pitoisuuden optimointikoe
Formaatti	24-kuoppalevy	24-kuoppalevy
Virusmäärä	60 µl	60 µl
Substraattipitoisuus (NaFluo)	1 µM	1 µM, 5 µM, 10 µM
Substraatin inkubaatio- aika	1 min, 5 min, 10 min, 20 min	5 min

Kuljetusaktiivisuus (soluunotto) -kokeen suorittaminen vaiheittain on esitetty Kuvassa 8. Kokeita varten valmistettiin TP-puskuria (Transport buffer), joka koostui 10x HBSS:stä (Hank's balanced salt solution; Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, Yhdysvallat), HEPES:stä (2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; Sigma Aldrich, Merck, Saksa), natriumbikarbonaatista (Sigma Aldrich, Merck, Saksa) sekä MilliQ-vedestä. TP-puskurin pH asetettiin 7.4. Pierce Coomassie Plus (Bradford; Thermo Scientific, ThermoFisher Scientific) -protokollaa käytettiin proteiinipitoisuuden määrittämisessä. Lyysinäytteiden absorbanssi ja fluoresenssi arvot mitattiin Varioskan Lux-mikrolevylukijalla (ThermoFisher Scientific).

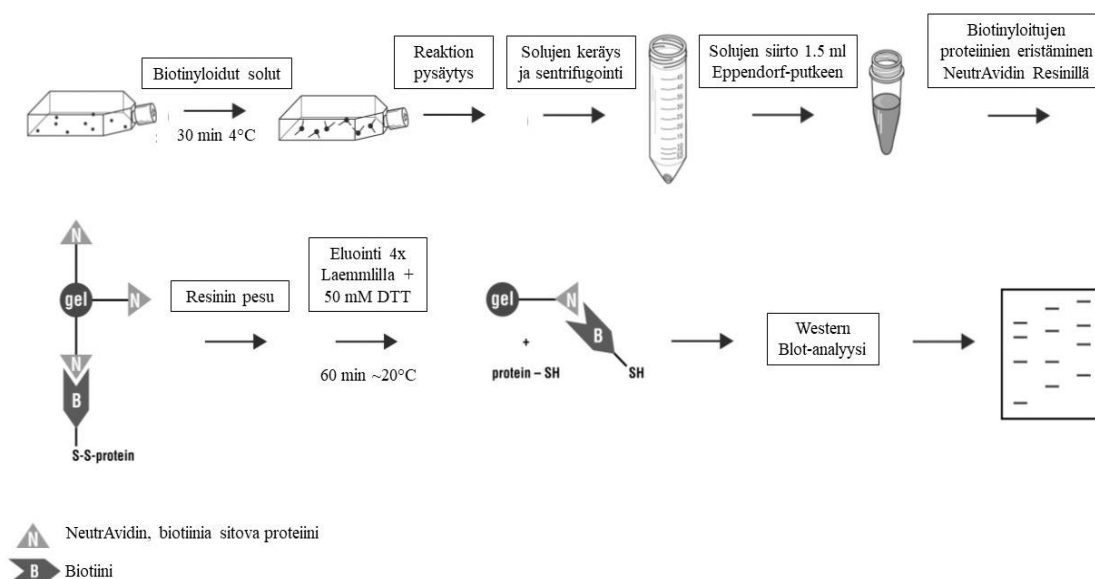


Kuva 8. Kuljetusaktiivisuuskokeen esivalmistelut ja suoritus.

5.6 Biotinylaatio ja Western blot

Western blot-menetelmää hyödynnettiin OATP1B3-kuljetinproteiinin proteiiniekspression määrittämiseksi soluista ja solun pinnalta. Tätä varten valmistettiin kokosolunäytteet sekä biotinyloidut proteiinifraktiot. Näytteitä varten ~90 %:sti konfluentit HEK293-solut jaettiin suhteessa 1:3 T75-soluviljelypulloihin ja annettiin kiinnittyä 37°C:ssa ja 5 % CO₂:ssa 24 tuntia. Solut transdukoitiin lisäämällä pulloihin 1.5 ml virusliuosta ja 700 µl 115 mM natriumbutyraattia, minkä jälkeen niitä inkuboitiin 37°C:ssa ja 5 % CO₂:ssa 48 tuntia.

Solun pinnan proteiininen eristäminen suoritettiin PierceTM Cell Surface Protein Isolation Kit -protokollan (Thermo Scientific, Rockford, IL, Yhdysvallat) mukaisesti. Kuvassa 9 esitetään menetelmä tiivistetysti. Transfektoidut HEK293-solut leimattiin jääkylmään PBS (Phosphate-buffered saline) -puskuriin liuotetulla biotinylaatioreagenssilla (EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin, sulfosukkinimidyyli-2-(biotiiniamido)etyyli-1,3-ditiopropionaatti; 0,25mg/ml) sekoittamalla sitä soluilla varovasti 30 minuuttia 4°C:ssa, jonka jälkeen solut hajotettiin ja leimatut proteiinit eristettiin NeutrAvidinTM Resinillä. Lopuksi kolonnin geeliin sitoutuneet proteiinit vapautettiin pelkistämällä biotiinin ja proteiinin välinen disulfidisidos 4x Laemmli-puskurilla (BioRad Laboratories Inc. Hercules, CA, Yhdysvallat), johon lisättiin pelkistäjäksi ditiotreitolia (DTT; 50 mM käyttökonsentraatiossa). PMSF-liuosta (phenylmethylsulfonyl fluoride, fenyylimetyylisulfonyylifluoridi; ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, Yhdysvallat) käytettiin proteaasi-inhibiittorina (0.1 mM käyttökonsentraatiossa) soluja hajotettaessa.



Kuva 9. Solukalvoproteiinien eristäminen OATP1B3-transfektoidujen HEK293-solujen pinnalta Western blot-analyysiä varten. Kuva on muokattu versio Pierce Cell Surface Protein Isolation-protokollassa esitetystä kuvasta (Thermo Scientific).

Kokosolunäytteitä varten HEK293-solut kerättiin ja hajotettiin lyysipuskurilla, joka koostui 50 mM:sta Tris-HCl:stä (pH 6.8), 0.5 %:sta (v/v) Triton X-100:sta, 150 mM:sta NaCl:sta, 1 mM:sta EDTA:sta ja MilliQ vedestä. Soluja inkuboitui lyysipuskurissa jäällä 30 minuuttia välillä sekoittaen, jonka jälkeen näytteet sentrifugoitiin 10 000 g ja 4°C:ssa 20 minuuttia. Kerätystä supernatantista määritettiin proteiinipitoisuus ja proteiinimäärä säädettiin 10-40 µg/kuoppa. Western Blot (WB)-näytteiden tekoa varten supernatanttiin lisättiin näytepuskuria (suhteessa 3:1), joka koostui 2-merkaptetanolista (BioRad Laboratories Inc. Hercules, CA, USA) ja 4x Laemmli-puskurista.

BCRP (Breast Cancer Resistance Protein, rintasyövän resistenssi proteiini)-vesikkelinäytettä käytettiin positiivisena kontrollina sekä työskentelykontrollina ja eYFP-proteiinin sisältäviä soluja, joissa ei ole primäärivasta-aineiden sitoutumiseksi vaadittavaa epitooppia, negatiivisena kontrollina. WB-näytteitä (10-30 µg proteiinia) ajettiin Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ geelillä (Biorad Laboratories Inc., Yhdysvallat) 200 V:ssa 40 minuuttia, jonka jälkeen ne siirrettiin Trans-Blot® Turbo™ membraanille (Biorad Laboratories Inc., Yhdysvallat). Blottauksen jälkeen membraania inkuboitui 5 %:ssa maito-

TBS-Tween 20-liuoksessa ravistelijassa 1 tunti tai yönyli +4°C:ssa. Membraani katkaisitiin ja toista puolta inkuboitiin Anti-OATP2/8 primäärivasta-aineella ja toista puolta Anti-BCRP primäärivasta-aineella 5 %:ssa maito-TBS-Tween 20-liuoksessa (1:1000) ravistelijassa 1 tunti tai yönyli +4°C:ssa. Membraanit pestiin TBS-Tween 20-liuoksella kolmesti 10 minuuttia kerrallaan, jonka jälkeen ne laitettiin Goat Anti-Mouse IgG-HRP-sekundäärivasta-ainetta sisältävään 2.5 %:een maito-TBS-Tween 20-liuokseen (1:2000) ja inkuboitiin ravistelijassa 1 tunti. Membraanit pestiin TBS-Tween 20-liuoksella kahdesti 15 minuutin ajan ja lopuksi 10 minuuttia TBS-liuoksella. Membraani käsiteltiin ECLTM Prime Western Blotting detektioireagenssilla (GE healthcare, AmershamTM, Buckinghamshire, Iso-Britannia) ennen niiden kuvantamista ChemiDoc XRS+ kuvantamislaitteella proteiinien havaitsemiseksi membraanilta.

5.7 Datat käsittely

OATP1B3-kuljetinproteiinin ja varianttien kuljetusaktiivisuus määritettiin laskemalla yksittäisen kokeen neljän rinnakkaisen kuopan proteiinimäärään (mg) ja testiaikaan (min) suhteutettu fluoresenssi intensiteetti (AFU, a fluorescence unit). OATP1B3-välitteinen soluunotto laskettiin vähentämällä edellä mainituista arvoista eYFP-kontrollin soluunotto. Varianttien soluunotto normalisoitiin OATP1B3-villityyppiin koekohtaisesti, jotta saatiin varianttien prosentuaalinen soluunotto villityypistä. Tulokset on ilmoitettu kolmen kokeen prosentuaalisen soluunoton keskiarvona \pm keskiarvon keskivirhe. Pitoisuuden optimointi-, aikalineaarisuus- ja virusmäärän optimointikokeita ei toistettu ja tulokset perustuvat kolmen rinnakkaisen kuopan proteiinimäärään (mg) ja testiaikaan (min) suhteutettujen fluoresenssi intensiteettien keskiarvoihin sekä keskihajontaan. NaFluo:n AFU-arvoista on vähennetty taustan osuus (tyhjän kuopan fluoresenssi), sillä sen suuruus (~350 AFU) katsottiin merkitykselliseksi tulosten kannalta.

Kuljetuksen farmakokinetikkaa ja affiniteettia kuljetinproteiiniin kuvaava parametri, K_m (pitoisuus, jossa kuljetusnopeus on puolet maksiminopeudesta), laskettiin epälineaarista käyränsovitusta (Michaelis-Menten-sovitus) hyödyntäen GraphPad Prism 8.2.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, Yhdysvallat) -ohjelman avulla. Ohjelmaa käytettiin myös

vertaamaan varianttien kuljetusaktiivisuuksia villityyppiin ja tilastollinen merkitsevyys laskettiin yksisuuntaisen varianssianalyysin (one-way ANOVA) ja Dunnet:in jatkotestin avulla. Tilastollisesti merkitseväenä pidettiin P-arvoja, jotka olivat alle 0.05.

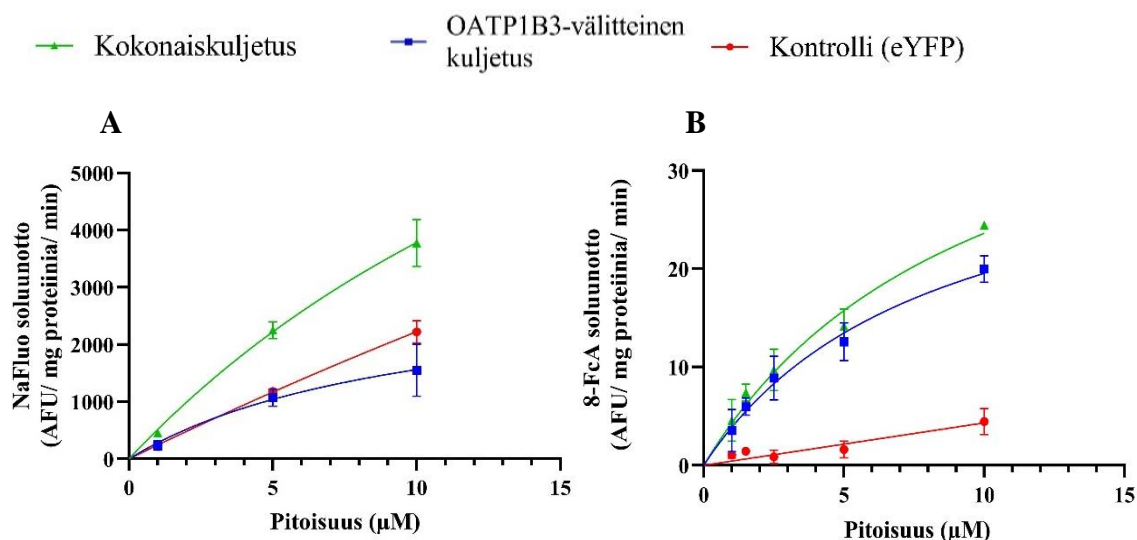
6 TULOKSET

6.1 TAA-lopetuskodonin lisääminen OATP1B3-kuljetinproteiiniin

Ensimmäisen sekvensoinnin jälkeen selvisi, että kaupalliseen *SLCO1B3*-geeniin pENTR223-1-plasmidissa ei ollut lisätty lopetuskodonia. TAA-lopetuskodoni lisättiin *SLCO1B3*-geeniin kohdennettua mutageneesia hyödyntäen ja lisäyksen varmistamiseksi geeni sekvensoitiin uudelleen ja lopetuskodonin paikka geenissä tarkistettiin Benchling -ohjelmaa hyödyntäen. Ennen ensimmäistä sekvensointia geenistä oli tehty jo P3-virusvarastoliuos, jonka takia tässä työssä on tutkittu myös keinotekoisen *SLCO1B3*-geenin pitkän version (WTP), joka ei sisällä lisättyä lopetuskodonia, kuljetusaktiivisuutta ja solukalvoekspressiota. WTP-variantin aminohapposekvenssin pituudeksi arvioitiin 717 aminohappoa (Liite 1).

6.2 OATP1B3-kuljetusaktiivisuuskokeen optimointi

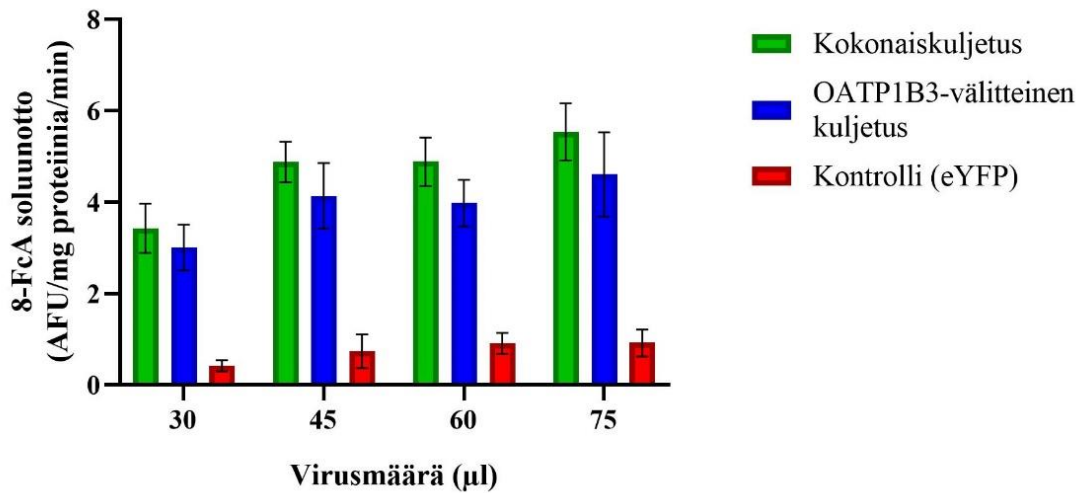
Koeolosuhteiden optimoimiseksi määritettiin käytettävä virusmäärä, substraattipitoisuus sekä testiaika. NaFluo:ta inkuboitiin kolmella pitoisuudella (1, 5 ja 10 μM) ja 8-FcA:ta viidellä pitoisuudella (1, 1.5, 2.5, 5 ja 10 μM) viiden minuutin ajan. Koepitoisuus määritettiin Kuvan 10 alueelta, jolloin soluunotto kasvoi lineaarisesti (NaFluo 5 μM :iin ja 8-FcA 2,5 μM :iin asti). Lisäksi koepitoisuuden valintaan vaikutti kokonaiskuljetuksen suhde eYFP:llä (kontrolli) transfektoidujen solujen kuljettamaan määrään. Kineettisten kokeiden perusteella NaFluo:n ja 8-FcA:n koepitoisuuksiksi valittiin 1 μM ja 2.5 μM , jolloin soluunotot olivat 2,1- ja 10,4-kertaisia kontrolliin verrattuna.



Kuva 10. NaFluo:n (A) ja 8-FcA:n (B) konsentraatiiriippuvuuden määrittäminen OATP1B3- ja eYFP-transfektoiduissa HEK293-soluissa. NaFluo:ta inkuboitettiin kolmella pitoisuudella (1, 5 ja 10 μM) ja 8-FcA:ta viidellä pitoisuudella (1, 1.5, 2.5, 5 ja 10 μM) viiden minuutin ajan. OATP1B3-välitteinen kuljetus (\blacksquare) on laskettu vähentämällä kokonaiskuljetuksesta (\blacktriangle) kontrollin (eYFP, \bullet) kuljetus. Tulokset on esitetty kolmen rinnakkaisen kuopan keskiarvona \pm keskihajonta.

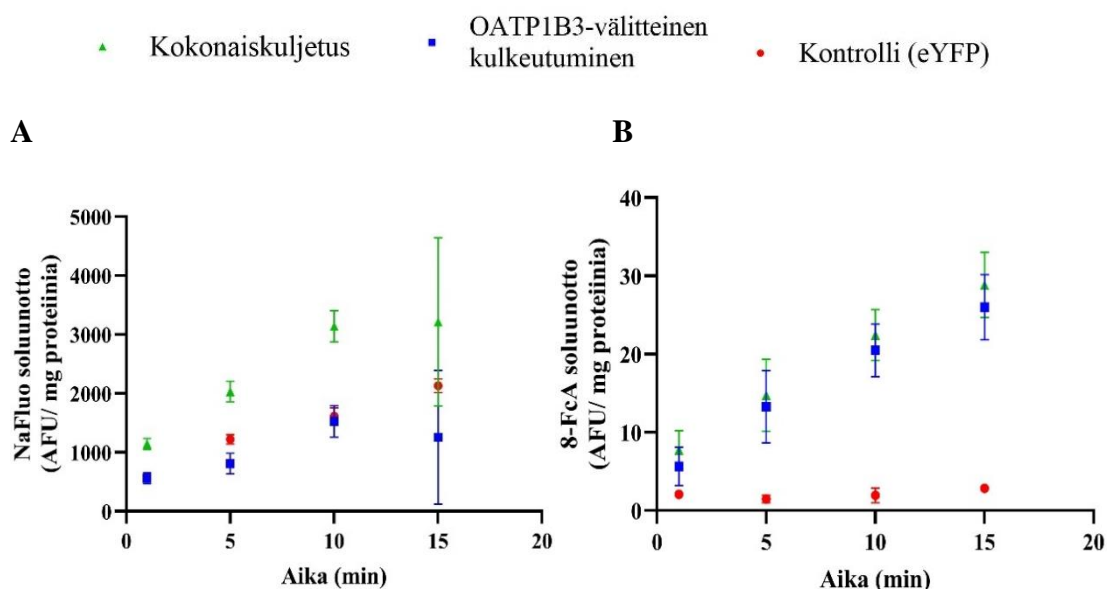
Kuljetuskineettisten parametrien laskemiseksi Kuvan 10 data analysoitiin Michaelis-Menten-sovitusta hyödyntäen. NaFluo:n ja 8-FcA:n K_m -arvoiksi saatiin 10.06 μM (95 %:n luottamusvälillä 0,49– ∞ , $R^2=0,99$) ja 8.23 μM (95 %:n luottamusvälillä 4,40–18,41, $R^2=0,92$). Fluoresenssin intensiteettiä (AFU) ei ole muutettu substraattimääräksi, jonka takia V_{\max} (maksimaalista kuljetusnopeutta) ei voitu laskea.

Kuljetusaktiivisuuskokeita varten optimoitiin myös transduktioon käytettävä virusmäärä. Tätä varten solut transduktoitiin neljällä eri virusmäärällä (30, 45, 60 ja 75 μl). Koe suoritettiin inkuboimalla 2,5 μM 8-FcA-liuosta HEK293-soluilla 3 minuuttia. Kuvassa 11 on esitetty 8-FcA:n soluunotto, kun solut on transduktoitu eri määrillä virusta. Kokeen perusteella soluunotto kontrolliin suhteutettuna oli korkein (8,4-kertainen), kun solut oli transduktoitu 30 μl :lla virusliuosta. Tällä virusmäärällä transduktoitiin HEK293-solut OATP1B3-villityypin ja varianttien kuljetusaktiivisuutta määritettäessä.



Kuva 11. 8-FcA:n (2,5 μM) soluunotto 3 minuutin inkubaation jälkeen, kun HEK293-solut 24-kuoppalevyllä oli transduktoitu eri määriä *SLCO1B3*- ja *eYFP*-rekombinanttibakuloviruksia. Sininen palkki kuvastaa OATP1B3-kuljetinproteiinin välityksellä tapahtuvaa soluunottoa, joka on laskettu vähentämällä kontrollin soluunotto (punainen palkki) kokonaiskuljetuksesta (vihreä palkki). Tulokset on esitetty kolmen rinnakkaisen kuopan keskiarvona ± keskihajonta.

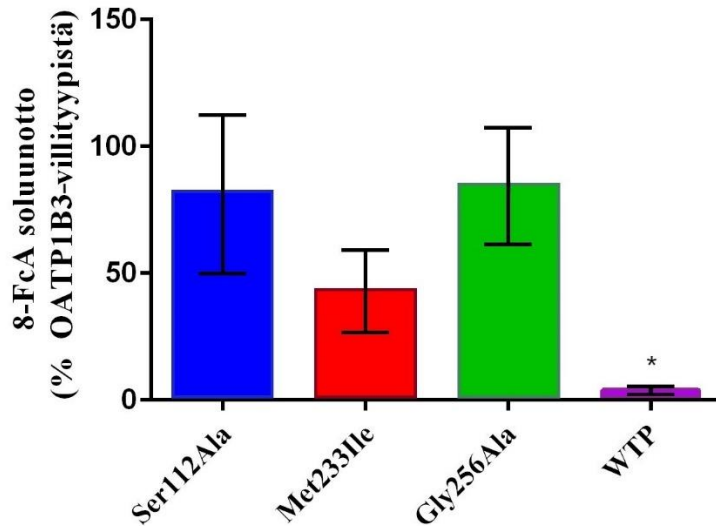
Soluunoton aikalinearisuutta määritettäessä 1 μM NaFluo-liuosta ja 2,5 μM 8-FcA-liuosta inkuboitui soluilla 1, 5, 10 ja 15 minuuttia. Kuvassa 12 on esitetty NaFluo:n ja 8-FcA:n soluunotot ajan funktiona. Kummankin substraatin soluunotto kasvoi lineaarisesti 10 minuuttiin asti. NaFluo:n ja 8-FcA:n testiajoiksi valittiin 10 minuttia ja 5 minuuttia, jolloin soluunotot olivat 2,5 -ja 6,9-kertaa suurempia kuin kontrollin.



Kuva 12. NaFluo:n (1 μ M; **A**) ja 8-FcA:n (2,5 μ M; **B**) soluunotto ajan funktiona OATP1B3- ja eYFP-transfektoiduissa HEK293-soluissa. Substraattiliuoksia inkuboitin soluilla 1, 5, 10 ja 15 minuuttia. OATP1B3-välitteinen kuljetus (■) on laskettu vähentämällä kontrollin (eYFP:n, ●) kuljetus kokonaiskuljetuksesta (▲). Tulokset on esitetty kolmen rinnakkaisen kuopan keskiarvona \pm keskihajonta.

6.3 Pistemutaatioiden 334T>G, 699G>A ja 767G>C sekä keinotekoisen *WTP*-geenin vaikutus OATP1B3-kuljetinproteiinin kuljetusaktiivisuuteen

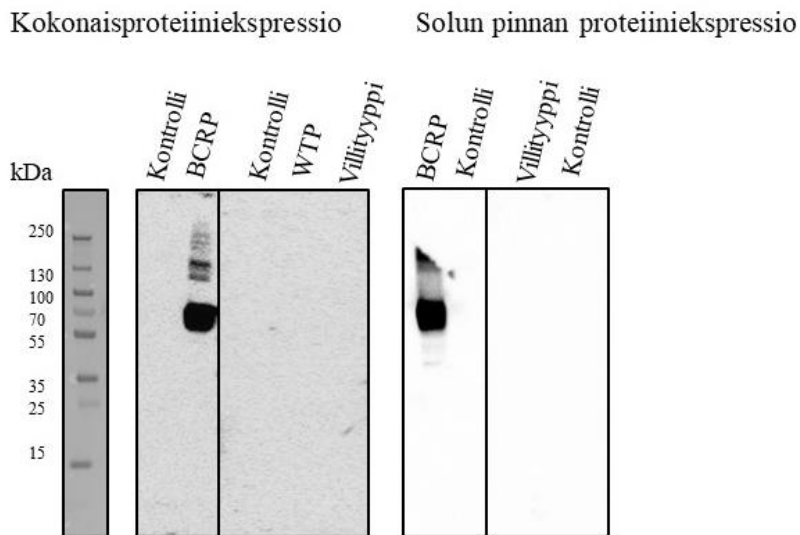
HEK293-solut transdukoitiin 30 μ l:lla *SLCO1B3*-villityypin geenin sekä 334T>G, 699G>A ja 767G>C pistemutaatiogeenien ja keinotekoisen *WTP*-geenin sisältävillä rekombinantti-bakulovirusilla. Kuljetinproteiinien kuljetusaktiivisuus määritettiin, kun HEK293-soluja oli inkuboitu 2,5 μ M:lla 8-FcA-liuoksella 5 minuuttia. Kuvassa 13 esitetään varianttien kuljetusaktiivisuudet suhteutettuna OATP1B3-villityypin kuljetusaktiivisuuteen. *WTP*-variantin kuljetusaktiivisuus heikentyi 96 %, mikä oli tilastollisesti merkitsevää ($P < 0.05$). Met233Ile-variantin kuljetusaktiivisuus vaikuttaa heikentyneen OATP1B3-villityypin kuljetusaktiivisuudesta, mutta ei tilastollisesti merkitsevästi ($P = 0.17$). Ser112Ala- ja Gly256Ala-varianttien kuljetusaktiivisuudet ovat verrattavissa villityypin kuljetusaktiivisuuteen.



Kuva 13. 8-FcA:n ($2,5 \mu\text{M}$) soluunotto *SLCO1B3*-geenin varianteilla transientisti transfektoiduissa HEK293-soluissa 5 minuutin inkubaation jälkeen. Varianttien soluunotto on esitetty prosentteina OATP1B3-villityypistä, jonka soluunotto on 100 %. Tulokset on laskettu 3 kokeen prosenttiosuuksien keskiarvoina \pm SEM. * tarkoittaa P-arvoa < 0.05 .

6.4 OATP1B3-kuljetinproteiinin ekspressio HEK293-soluissa

Western blot-menetelmää hyödynnettiin OATP1B3-kuljetinproteiinin kokonaisekspression sekä solun pinnan biotinyloitujen proteiinien määrittämisessä HEK293-soluissa. Tarkoituksena oli selvittää, eroaako varianttien kokonais- ja solun pinnan ekspressiotaso OATP1B3-villityypin ekspressiotasosta. Kuvassa 14 näkyy ettei OATP1B3-villityyppiä eikä sen WTP-varianttia (vain kokosolunäytteessä) kuitenkaan havaittu kokosolu- eikä solunpinnan WB-näytteissä. Ainoastaan työskentelykontrollin, BCRP:n, kohdalla havaittiin suuri intensiivinen raita, joka sijoittui noin 55-75 kDa välille molemmissa näytteissä. Koska villityypin OATP1B3-kuljetinproteiinia ei havaittu kummassakaan WB-näytteessä, ei myöskään muiden varianttien ekspressiota tutkittu tarkemmin.



Kuva 14. OATP1B3-, WTP- ja BCRP-kuljetinproteiinien sekä kontrollin (eYFP:n) kokonais- (vasemmalla) ja solun pinnan proteiiniekspressio (oikealla). Kokosolulysaatit sekä solun pinnan biotinyloidut proteiininäytteet ajettiin geelille SDS-PAGE-elektroforeesilla ja lopulta siirrettiin nitroselluloosa membraanille. Membraanit käsiteltiin Anti-OATP2/8 sekä Anti-BCRP primäärivasta-aineilla sekä Goat Anti-Mouse IgG-HRP-sekundääri-vasta-aineella. Vasemmalla olevan palkin avulla voidaan arvioida ekspressoituneen proteiinin molekyylipaino (kDa).

7 POHDINTA

7.1 OATP1B3-kuljetinproteiinin tuottaminen

OATP1B3-kuljetinproteiinin tuottamisessa voidaan hyödyntää erilaisia transfektio menetelmiä ja soluja. Letschert kumppaneineen (2004) tuottivat OATP1B3-kuljetinproteiinin villityyppiä ja variantteja MDCKII- ja HEK293-soluissa hyödyntäen liposomipohjaista Metafectene® -transfektioagenssia (Biontex) *SLCO1B3*-ekspressioplasmidien transfektioon. Schwartz kumppaneineen (2011) puolestaan infektivat HeLa-solut ensin rekombinantti-vaccinia-viruksilla (vTF-7), jonka jälkeen ne transfektoitiin *SLCO1B3*-ekspressioplasmideilla liposomipohjaisen Lipofectin® -transfektioagenssin (Invitrogen) avulla. Tässä tutkimuksessa taas havaittiin, että myös rekombinantti-bakulovirusten avulla *SLCO1B3*-geeni voidaan viedä HEK293-soluihin.

Eri solujen käyttö eri tutkimuksissa voi kuitenkin johtaa eroihin OATP1B3-varianttien kuljetusaktiivisuuksissa (Letschert ym. 2004; Schwarz ym. 2011). Schwarz kumppaneineen (2011) havaitsivat, että CCK8 Met233Ile-välitteinen soluunotto heikentyi tilastollisesti merkitsevästi OATP1B3-villityypistä HeLa-soluissa, kun taas Letschert työryhmineen (2004) eivät havainneet heikentymistä CCK8 soluunotossa MDCKII-soluissa. Eri soluilla voi olla OATP1B3-kuljetinproteiinin lisäksi erilaisia endogeenisiä kuljetinproteiineja, jotka voivat kuljettaa tutkittavaa substraattia soluun tai solusta ulos, mikä voi aiheuttaa eroja tuloksissa tutkimusten välillä (Schwarz ym. 2011).

Eri transfektiomenetelmien käyttö eri tutkimuksissa voi puolestaan johtaa vaihteluun kuljetinproteiinimäärissä, mikäli menetelmä aiheuttaa esimerkiksi eroja elinkykyisten solujen määrissä transfektion jälkeen. Vaikutusta pyritään vähentämään suhteuttamalla kuljetinproteiinin soluunotto kuopassa olevaan proteiinimäärään. Tästä ei voida kuitenkaan päätellä, kuinka suuri osuus kokonaisproteiinimäärästä on tutkittavaa kuljetinproteiinia, vaan se kertoo lähinnä kuopassa olevasta solumäärästä. Suhteuttamalla variantin soluunotto villityypin soluunottoon voidaan vähentää transfektiomenetelmän aiheuttamaa vaikutusta kuljetinproteiinimääriin ja kuljetusaktiivisuuteen, sillä menetelmän vaikutus elinkykyisten solujen määrään on todennäköisesti samaa suuruusluokkaa niin varianteilla kuin villityypilläkin transfektoiduissa soluissa. Vertailukelpoisempia *in vitro*-tuloksia pistemutaatioiden vaikutuksista OATP1B3-kuljetinproteiinin toimintaan voitaisiin todennäköisemmin saada, mikäli uusissa tutkimuksissa hyödynnettäisiin aikaisemmissa tutkimuksissa käytettyjä ekspressiomenetelmiä ja substraatteja, jolloin eri tutkimuksissa saatuja K_m - ja V_{max} -arvoja sekä kuljetusaktiivisuuksien muutoksia voitaisiin luotettavammin vertailla keskenään.

Bac-to-bac bakulovirusekspressio -protokollan mukaan Sf9-solujen transfektioon tulisi käyttää bakmidi-DNA:ta 1-2 $\mu\text{g}/8 \times 10^5$ solua. Tässä työssä käytettiin T25-soluviljelypulloa, johon istutettiin 2.5×10^6 solua kiinnittymään 1 tunti ennen transfektiota, jolloin bakmidi-DNA:n määrä ohjeistettiin säädettävän 3.125–6.25 μg välille. Vertailukelpoisuuden parantamiseksi villityypin ja varianttien bakmidi-DNA-liuokset pitäisi laimentaa

samaan pitoisuuteen. Laimentaminen jäi kuitenkin tekemättä ja siksi eri varianttien transfektiossa käytetyt DNA-määrät eroavat toisistaan ja ovat yli suositellun määrän villityypillä, 334T>G:llä, 699G>A:lla sekä 767G>C:llä ja puolestaan alle suositellun määrän WTP:llä (Taulukko 7). Myöskään protokollan mukaisia määrittämiä virustiittereistä (pfu/ml) ei tehty. Virustiitteriä ja MOI-arvoa (Multiplicity of Infection), joka määrittellään viruspartikkelien määränä solua kohden, voidaan hyödyntää esimerkiksi Sf9-solujen tai HEK293-solujen transduktioon tarvittavan virusliuostilavuuden määrittämisessä, kun transduktoitava solumäärä tiedetään.

Bakulovirusten määrä eri virusvarastoliuoksissa voi siis erota toisistaan, mikä voi yhdessä eri bakmidi-DNA:n määrien kanssa saada aikaan eroja kuljetinproteiinien välillä niiden kuljetusaktiivisuuksissa, jos viruksien ja bakmidi-DNA määrien erot transduktoitavissa rekombinantti-bakulovirusliuoksissa ovat aiheuttaneet eroja kuljetinproteiinimäärissä soluissa. Tämä tekee eri varianttien ja villityypin keskinäisestä vertailusta epäluotettavampaa. Kuitenkin erot villityypin, 334T>G:n, 699G>A:n ja 767G>C:n bakmidi-DNA määrien välillä olivat melko pieniä (korkeintaan 15 %), joten niiden vaikutus proteiinimäärien eroihin on todennäköisesti vähäistä. WTP-variantin bakmidi-DNA:ta käytettiin Sf9-solujen transfektiossa puolestaan yli 2.7-kertaa vähemmän kuin muiden varianttien ja villityypin bakmidi-DNA:ta. Tästä johtuen WTP-proteiinin määrä soluissa saattaakin olla alhaisempi kuin muiden varianttien ja villityypin. Varianttien ja villityypin bakmidi-DNA:n määrä tulisi säätää yhtä suureksi ja virustiitteri määrittää, jotta voidaan luotettavasti arvioida tämän tutkimuksen puutteiden vaikutusta OATP1B3-villityypin ja varianttien kuljetusaktiivisuuksiin.

7.2 OATP1B3-kuljetusaktiivisuuskokeen optimointi

OATP1B3-villityypin ja sen varianttien kuljetusaktiivisuuden määrittämisessä hyödynnettiin fluoresenssiin perustuvaa analyysimenetelmää. Se on nopea menetelmä, jolla voidaan välttää radioaktiivisten aineiden käyttöä kuljetinproteiinin kuljetusaktiivisuutta tai inhibitiota määritettäessä *in vitro*. Fluoresenssiin perustuvia menetelmiä on myös aiemmin hyö-

dynnetty OATP1B3-kuljetinproteiinin kuljetusaktiivisuutta sekä inhibitiota määritettäessä (De Bruyn ym. 2011; Izumi ym. 2016). Tämän tutkimuksen optimointivaiheeseen valikoitui kaksi fluoresoivaa substraattia, NaFluo ja 8-FcA. Niiden on aiemmissa tutkimuksissa havaittu soveltuvan substraateiksi OATP1B3-kuljetusaktiivisuutta määritettäessä (Bednarczyk 2010; De Bruyn ym. 2011; Izumi ym. 2016). Esimerkiksi 2 μM 8-FcA:n soluunoton havaittiin olevan noin 75-kertaa suurempaa kuin vektori kontrollin 5 minuutin inkubaation jälkeen OATP1B3-kuljetinproteiinia ekspressoivissa CHO-soluissa (Bednarczyk 2010). Tässä tutkimuksessa niin testiaikaa kuin substraattipitoisuuttakin määritettäessä 8-FcA:n kokonaiskuljetus kontrolliin suhteutettuna oli suurempaa kuin NaFluo:n, jonka takia 8-FcA valikoitui substraatiksi OATP1B3-varianttien kuljetusaktiivisuutta määrittäviin kokeisiin (Kuva 10, Kuva 12). NaFluo kulkeutuu todennäköisesti tehokkaammin HEK293-solujen solukalvon läpi passiivisesti tai endogeenisten kuljetinproteiinien välityksellä. Lisäksi myös aikaisemmassa tutkimuksessa havaittiin, että 8-FcA:n soluunotto kontrolliin suhteutettuna oli suurempaa kuin NaFluo:n OATP1B3-kuljetinproteiinia ekspressoivissa HEK293-soluissa (Izumi ym. 2016).

Tässä tutkimuksessa optimoitiin myös kuljetusaktiivisuuskokeisiin käytettävä virusmäärä. Kokeen perusteella HEK293-solujen transduktioon käytettävän OATP1B3-virusliuoksen määrä ei tarvitse olla 30 μl :aa enempää, koska suuremmilla virusmäärillä kontrollin osuus soluunotosta kasvaa suhteessa enemmän (Kuva 11). Kun HEK293-solut transdukoitiin 45 μl :lla, 60 μl :lla ja 75 μl :lla virusliuosta, soluunotot olivat alhaisempia kontrolliin nähden (8.1-, 6.3- ja 7.0-kertaisia). Kokonaiskuljetus kasvaa suuremmilla virusmäärillä, mutta todennäköisesti johtuen ennemmin passiivisen diffuusion osuuden kasvusta kuin OATP1B3-välitteisen soluunoton kasvusta. Lisäksi Bac-to-bac protokollan mukaan liian suuri virustiitteri voi johtaa alhaisempaan proteiiniekspressioon, mikä saattaa vaikuttaa myös substraatin soluunottoon.

Mitä alhaisempi on K_m , sitä pienempi pitoisuus substraattia tarvitaan saavuttamaan puolet maksimaalisesta kuljetusnopeudesta (Rowland ja Tozer 2011). Tämän tutkimuksen perusteella 8-FcA:n ($K_m=8.23 \mu\text{M}$) ja NaFluo:n ($K_m=10.06 \mu\text{M}$) affiniteetit eivät juuri eronneet ja 95 % luottamusvälien hajonnat olivat suuria. Jotta K_m ja V_{\max} -arvot voidaan laskea

mahdollisimman luotettavasti, tulisi testattavia pitoisuuksia olla konsentraatiiriippuvuutta määritettäessä riittävästi V_{\max} :n saavuttamisen jälkeen. Myös Bednarczyk (2010) tutki, että OATP1B3-välitteinen 8-FcA:n soluunotto oli aikariippuvaista ja saturoituvaa ($K_m=1.8 \mu\text{M}$ ja $V_{\max}=0.33 \text{ pmol/min/cm}^2$). Kuitenkin K_m on paljon tässä kokeessa saatua tulosta alhaisempi. Bednarczyk (2010) käytti 7 pitoisuutta välillä $0.25\text{--}25 \mu\text{M}$ ja soluunotto saavutti saturaation suuremmilla 8-FcA-pitoisuuksilla. Tässä tutkimuksessa 8-FcA:n soluunotto ei saavuttanut saturaatumista, jonka takia K_m -arvoa ei voida pitää yhtä luotettavana kuin aiemmassa tutkimuksessa. De Bruyn kumppaneineen (2011) puolestaan määrittivät NaFluo:n K_m -arvoksi $10.9 \mu\text{M}$, joka on linjassa tämän tutkimuksen kanssa. Tässä tutkimuksessa saatu NaFluo:n K_m -arvo on kuitenkin epäluotettava, sillä 95 % luottamustason hajonta oli $0.49\text{--}\infty$. Muutaman koepitoisuuden lisäys konsentraatiiriippuvuutta määritettäessä olisi todennäköisesti antanut luotettavamman arvion K_m -arvosta.

7.3 OATP1B3-varianttien kuljetusaktiivisuus

Tässä työssä tutkittiin kolmen aiemmin löydetyn OATP1B3-kuljetinproteiinin geneettisen variantin (Ser112Ala, Met233Ile ja Gly256Ala) toimintaa. Taulukon 2 mukaan 334T>G- ja 699G>A-pistemutaatioiden esiintyvyydet useissa etnisissä ryhmissä ovat hyvin korkeita ($\text{MAF}>0.5$). Sen perusteella aiemmissa tutkimuksissa käytetty sekä tietokannoista löytyvä OATP1B3-villityyppi ei todennäköisesti ole todellinen villityyppi. Vaikka *in vitro*-tutkimustietoa 334T>G ja 699G>A pistemutaatioiden vaikutuksista OATP1B3-kuljetinproteiinin toimintaan löytyy, eri tutkimusten tulokset eivät ole täysin linjassa keskenään (Letschert ym. 2004; Schwarz ym. 2011). Lisäksi aiempaan tutkimukseen perustuen pistemutaatio 767G>C ei heikentänyt OATP1B3-kuljetinproteiinin toimintaa tilastollisesti merkitsevästi, vaikka variantin kokonaisekspressio oli heikentynyt (Schwarz ym. 2011). Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli vahvistaa tutkimustietoa edellä mainittujen geneettisten varianttien vaikutuksista OATP1B3-kuljetinproteiinin toimintaan.

Optimoidulla OATP1B3-kuljetusaktiivisuuskokeella määritettiin geneettisten varianttien kyky kuljettaa 8-FcA:ta HEK293-soluihin. Tulosten perusteella varianttien, lukuun ottamatta WTP-varianttia, kuljetusaktiivisuudet eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi

OATP1B3-villityypin kuljetusaktiivisuudesta. Kuitenkin Met233Ile-variantin kuljetusaktiivisuus heikentyi alle 50 %:iin villityypistä, mutta ei tilastollista merkitsevästi ($P=0.17$). Tämä voi johtua villityypin kuljetusaktiivisuuden suuresta kokekohtaisesta vaihtelusta. Erityisesti 2. kokeen villityypin muita kokeita alhaisempi proteiinimäärä (~0.035 mg) sekä korkeampi fluoresenssi ($AFU>2$) nostivat sen kuljetusaktiivisuuden noin 3- ja 5-kertaisiksi kahteen muuhun kokeeseen verrattuna. Alhaisempi proteiinimäärä saattaa-kin riittää proteiinin optimaaliseen solukalvoekspressioon ja siten parantaa OATP1B3-välitteistä soluunottoa. Proteiinimäärää analysoitaessa näytteet otettiin vain kerran 24-kuoppalevyn joka kuopasta, jolloin näytteessä (10 μ l) on voinut olla vähemmän proteiinia, sillä se ei välttämättä ole tasaisesti jakautunut kuopan liuokseen. Näytteistä otettu keskiarvo voi siten vääristää todellista proteiinimäärää. Toisaalta, koska villityypin kaikkien kuoppien proteiinimäärä oli varianttien ja eYFP:n proteiinimääriä alhaisempi 2. kokeessa, edellä mainitulla näytteenotto -menetelmällä ei todennäköisesti ole suurta merkitystä.

Tässä tutkimuksessa käytettiin ensimmäistä kertaa 8-FcA-substraattia OATP1B3-varianttien kuljetusaktiivisuuden tutkimiseen. Tulosten vertailu kahteen aiempaan tutkimukseen, jossa käytettiin eri substraatteja, on siksi suuntaa antavaa, sillä substraattien sitoutumiskohdat voivat vaihdella OATP1B3-kuljetinproteiinissa, jolloin aminohappomuutos tiettyssä kohdassa proteiinia ei välttämättä vaikuta samoin kaikkien substraattien soluunottoon. Ser112Ala- ja Gly256Ala-varianttien kuljetusaktiivisuudet eivät kuitenkaan eronneet villityypistä, mikä on linjassa Schwarzin ja kumppaneiden (2011) tutkimuksen kanssa, jossa substraattina käytettiin CCK8:aa. Toisaalta Letschertin ja kumppaneiden (2004) mukaan Ser112Ala-variantin kuljetusaktiivisuus kasvoi villityypistä, kun substraatteina käytettiin CCK8:aa, DHEAS:a tai E_3S :a. Puolestaan Met233Ile-variantin kuljetusaktiivisuus heikentyi, kun substraatteina käytettiin CCK8:aa tai rosvastatiinia (Schwarz ym. 2011). Jos kuitenkin substraattina käytettiin atorvastatiinia, BSP:tä, C-tautaa, DHEAS:a tai $E_217\beta G$:tä, Met233Ile-variantin kuljetusaktiivisuus ei heikentynyt (Letschert ym. 2004; Schwarz ym. 2011). Taulukossa 10 on verrattu tämän tutkimuksen tuloksia OATP1B3-varianttien toiminnasta aiempiin tutkimustuloksiin.

Taulukko 10. OATP1B3-varianttien kuljetusaktiivisuuksien muutokset villityyppiin verrattuna eri substraatteja tutkittaessa.

Variantti	Substraatti ja kuljetusaktiivisuuden muutos	Substraatti ja kuljetusaktiivisuuden muutos ^c
334T>G (Ser112Ala)	BSP ja E ₂ 17βG ~ ^b CCK8, C-tau, DHEAS ja E ₃ S ↑ ^b CCK8 ~ ^a	8-FcA ~
699G>A (Met233Ile)	BSP, CCK8, C-tau, DHEAS ja E ₂ 17βG ~ ^b E ₃ S ↑ ^b atorvastatiini ~ ^a CCK8 * ja rosuvastatiinia ** ↓ ^a	8-FcA ↓
767G>C (Gly256Ala)	CCK8 ~ ^a	8-FcA ~
WTP	-	8-FcA *↓

a) Schwartz et al. 2011 b) Letschert et al. 2004 ja c) tämän tutkimuksen tulos. Merkinnät ~, ↑ ja ↓ tarkoittavat ei muutosta, lisäys tai heikentyminen OATP1B3-villityypistä. * ja ** tarkoittavat tilastollisesti merkitsevää heikentymistä P<0.05 ja P<0.001.

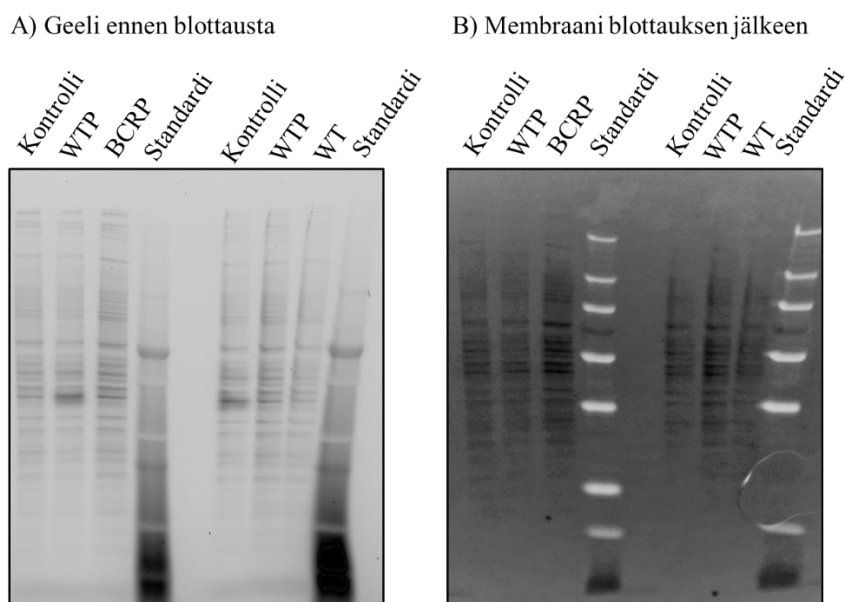
Tässä tutkimuksessa tutkittiin ensimmäistä kertaa keinotekoisen OATP1B3-WTP-variantin kuljetusaktiivisuutta. Se tuotettiin ilman geeniin lisättyä lopetuskodonia. Sen pituus on arviolta 15 aminohappoa pidempi kuin 702 aminohaposta koostuvan OATP1B3-villityypin aminohapposekvenssi. Lopetuskodoni WTP-geeniin tulee arvion mukaan Bacmam-plasmidista. WTP-variantin kuljetusaktiivisuus on verrattavissa negatiiviseen kontrolliin, eYFP:hen. Se on vain 4 % OATP1B3-villityypin kuljetusaktiivisuudesta, joten WTP on lähes kykenemätön kuljettamaan 8-FcA:ta. OATP1B3-kuljetinproteiinin C-terminaaliossa päässä oleva aminohappohäntä voi siis estää kuljetinproteiinin toiminnan. Sen toimimattomuus saattaa johtua proteiinin muuttuneesta kolmiulotteisesta rakenteesta ja sen seurauksena tapahtuneesta hajoamisesta, vähentyneestä solukalvoekspressiosta tai muuttuneesta lokalisaatiosta. Kuitenkin tutkimustietoa WTP-variantin sijainnista, kokonais- ja solukalvoekspressiosta solussa tarvitaan, jotta voidaan luotettavasti arvioida syitä sen toimimattomuuteen.

Kuten Taulukosta 10 selviää, selkeitä johtopäätöksiä Met233Ile sekä Ser112Ala-varianttien vaikutuksista OATP1B3-kuljetusaktiivisuuteen ei voida tehdä aiempien eikä tämän tutkimusten perusteella. Tämänhetkisen tutkimustiedon mukaan Ser112Ala-variantin

kuljetusaktiivisuus on siis joko lisääntynyt tai muuttumaton ja Met233Ile-variantin heikentynyt tai muuttumaton villityyppiin verrattuna. Lisäksi kuten Schwarz kumppaneineen (2011) havaitsivat jo aiemmin, myöskään tässä tutkimuksessa Gly256Ala-variantin kuljetusaktiivisuus ei eronnut tilastollisesti merkitsevästi OATP1B3-villityypistä, joten nykyisen tutkimustiedon valossa sen toiminta on verrattavissa villityyppiin. Erityisesti lisää *in vitro* tutkimusta tässä työssä tutkittujen pistemutaatioiden vaikutuksista OATP1B3-lääkeainesubstraattien soluunottoon tarvitaan.

7.4 OATP1B3-kuljetinproteiinin proteiiniekspression määrittämisen haasteet

WB-menetelmää hyödynnettiin OATP1B3-kuljetinproteiinin proteiiniekspression määrittämiseen kokosolusta sekä solun pinnalta. Menetelmää voidaan hyödyntää tutkittaessa pistemutaatioiden vaikutuksia kuljetinproteiinien määriin koko solussa sekä solukalvolla. Tässä tutkimuksessa käytetty WB-menetelmä ei toiminut OATP1B3-villityypin eikä WTP-variantin ekspression määrittämisessä, jonka takia ei muiden varianttien proteiiniekspressiota tutkittu. Kuvasta 15 kuitenkin nähdään, että kokosolunäytteet sisälsivät proteiineja. Todennäköisimmät syyt siihen, että proteiiniekspression määrittäminen ei onnistunut ovat primäärivasta-aineen epäonnistunut kiinnittyminen OATP1B3-kuljetinproteiiniin tai sekundäärivasta-aineen epäonnistunut kiinnittyminen primäärivasta-aineeseen. Valmistajalla, Novus Biologicalsilla, ei myöskään ole tiedossa epitooppia, johon primäärivasta-aineen tulisi kiinnittyä OATP1B1- ja OATP1B3-kuljetinproteiineissa. Voi myös olla mahdollista, että kokosolunäytteitä tehtäessä solujen hajotuksen yhteydessä OATP1B3-proteiinit ovat saostuneet solujen muiden osien mukana pellettiin eivätkä sen takia ole määritettävissä.



Kuva 15. Kokonaisproteiiniexpressioon määrittäminen WB-menetelmää hyödyntäen kokosolulysaateista. Kuvassa A näytteet on ajettu geelille SDS-PAGE-elektroforeesilla. Kuvassa B näytteet on siirretty nitroselluloosa membraanille.

Aiempien tutkimusten perusteella Met233Ile-variantin proteiiniexpressiossa ei ole havaittu muutoksia HeLa-, HEK293- eikä MDCKII-soluissa toisin kuin Ser112Ala-variantilla, jonka kokonaisexpressioon havaittiin kasvaneen villityypistä HeLa-soluissa (Letschert ym. 2004; Schwarz ym. 2011). Met233Ile-variantin mahdollisesti heikentyneen kuljetusaktiivisuuden taustalla ei siis todennäköisesti ole proteiiniexpressioon heikentyminen. Lisäksi Schwarz kumppaneineen (2011) havaitsivat, että Gly256Ala-variantin kokonaisexpressio heikentyi villityypistä HeLa-soluissa. Gly256Ala-variantin kokonaisexpressioon heikentymisellä tai Ser112Ala-variantin kokonaisexpressioon kasvamisella ei kuitenkaan myöskään todennäköisesti ole vaikutusta niiden kuljetusaktiivisuuteen, koska kuljetusaktiivisuudet olivat verrattavissa villityypisiin (Schwarz ym. 2011). WTP-variantin proteiiniexpressioon muutoksien vaikutuksia sen heikentyneeseen kuljetusaktiivisuuteen ei voida arvioida, sillä aiempaa tutkimustietoa ei WTP-variantista ole.

8 JOHTOPÄÄTÖKSET

Farmakogeneettiset *in vitro* -tutkimukset auttavat ymmärtämään vastaavien kliinisten tutkimusten tuloksia sekä ennustamaan harvinaisten pistemutaatioiden vaikutuksia *in vivo*. Tämän tutkimuksen perusteella OATP1B3-kuljetinproteiinin sekä sen geneettisten varianttien, Ser112Ala, Met233Ile ja Gly256Ala, toimintaa voidaan tutkia hyödyntäen ohimenevästi rekombinantti bakuloviruksilla transfektoituja HEK293-soluja. Mallisubstraattina näissä tutkimuksissa voidaan hyödyntää 8-FcA:ta. Tämän tutkimuksen perusteella Ser112Ala-, Met233Ile- ja Gly256Ala-varianttien kuljetusaktiivisuudet eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi OATP1B3-villityypistä. Siitä huolimatta Met233Ile-variantin kuljetusaktiivisuus vaikuttaa hieman heikentyneen. Nykyisen tiedon mukaan Ser112Ala-variantin kuljetusaktiivisuus on joko lisääntynyt tai muuttumaton, Met233Ile-variantin heikentynyt tai muuttumaton ja Gly256Ala-variantin muuttumaton OATP1B3-villityyppiin verrattuna. Keinotekoisen WTP-variantin kuljetusaktiivisuus oli puolestaan vain 4 % villityypistä. Todennäköisesti aminohappohäntä WTP-variantin C-terminaalissa päässä inaktivoi kuljetinproteiinin toiminnan. Tämän tutkimuksen perusteella ei voida tehdä johtopäätöksiä tutkittujen OATP1B3-varianttien sijainnista, solukalvo- tai kokonaisekspressiosta. Lisää *in vitro* tutkimusta Ser112Ala-, Met233Ile- ja Gly256Ala-varianttien vaikutuksista erityisesti lääkeainesubstraattien kuljetukseen tarvitaan, jotta voidaan luotettavammin ennustaa niiden kliinistä merkitystä, sillä pistemutaation aiheuttama soluunoton heikentyminen tai lisääntyminen voi olla substraattikohtaista. Lisäksi tutkimusta WTP-variantin sijainnista, solukalvo- ja kokonaisekspressiosta tarvitaan, jotta voidaan luotettavammin arvioida sen toimimattomuuden syitä.

KIRJALLISUUSLUETTELO

Abe T, Unno M, Onogawa T, Tokui T, Kondo TN, Nakagomi R, Adachi H, Fujiwara K, Okabe M, Suzuki T, Nunoki K, Sato E, Kakyo M, Nishio T, Sugita J, Asano N, Tanemoto M, Seki M, Date F, Ono K, Kondo Y, Shiiba K, Suzuki M, Ohtani H, Shimosegawa T, Iinuma K, Nagura H, Ito S, Matsuno S: LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology* 120 (7): 1689-1699, 2001

Alam K, Crowe A, Wang X, Zhang P, Ding K, Li L, Yue W: Regulation of Organic Anion Transporting Polypeptides (OATP) 1B1- and OATP1B3-Mediated Transport: An Updated Review in the Context of OATP-Mediated Drug-Drug Interactions. *Int J Mol Sci* 19 (3): 2018a

Alam K, Farasyn T, Crowe A, Ding K, Yue W: Treatment with proteasome inhibitor bortezomib decreases organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B3-mediated transport in a substrate-dependent manner. *PLoS One* 12 (11): e0186924, 2017

Alam K, Farasyn T, Ding K, Yue W: Characterization of Liver- and Cancer-type-Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP) 1B3 Messenger RNA Expression in Normal and Cancerous Human Tissues. *Drug Metab Lett* 12 (1): 24-32, 2018b

Bednarczyk D: Fluorescence-based assays for the assessment of drug interaction with the human transporters OATP1B1 and OATP1B3. *Anal Biochem* 405 (1): 50-58, 2010

Boyer JL, Graf J, Meier PJ: Hepatic transport systems regulating pHi, cell volume, and bile secretion. *Annu Rev Physiol* 54 415-438, 1992

Briz O, Romero MR, Martinez-Becerra P, Macias RI, Perez MJ, Jimenez F, San Martin FG, Marin JJ: OATP8/1B3-mediated cotransport of bile acids and glutathione: an export pathway for organic anions from hepatocytes? *J Biol Chem* 281 (41): 30326-30335, 2006

Burt HJ, Riedmaier AE, Harwood MD, Crewe HK, Gill KL, Neuhoff S: Abundance of Hepatic Transporters in Caucasians: A Meta-Analysis. *Drug Metab Dispos* 44 (10): 1550-1561, 2016

Chen Y, Chen L, Zhang H, Huang S, Xiong Y, Xia C: Interaction of Sulfonylureas with Liver Uptake Transporters OATP1B1 and OATP1B3. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 123 (2): 147-154, 2018

Chen Y, Zhang W, Huang WH, Tan ZR, Wang YC, Huang X, Zhou HH: Effect of a single-dose rifampin on the pharmacokinetics of pitavastatin in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 69 (11): 1933-1938, 2013

Chu X, Cai X, Cui D, Tang C, Ghosal A, Chan G, Green MD, Kuo Y, Liang Y, Maciolek CM, Palamanda J, Evers R, Prueksaritanont T: In vitro assessment of drug-drug interaction potential of boceprevir associated with drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metab Dispos* 41 (3): 668-681, 2013

Chun SE, Thakkar N, Oh Y, Park JE, Han S, Ryoo G, Hahn H, Maeng SH, Lim YR, Han BW, Lee W: The N-terminal region of organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) plays an essential role in regulating its plasma membrane trafficking. *Biochem Pharmacol* 131 98-105, 2017

Cui Y, Konig J, Leier I, Buchholz U, Keppler D: Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6. *J Biol Chem* 276 (13): 9626-9630, 2001

De Bruyn T, Fattah S, Stieger B, Augustijns P, Annaert P: Sodium fluorescein is a probe substrate for hepatic drug transport mediated by OATP1B1 and OATP1B3. *J Pharm Sci* 100 (11): 5018-5030, 2011

de Graan AJ, Lancaster CS, Obaidat A, Hagenbuch B, Elens L, Friberg LE, de Bruijn P, Hu S, Gibson AA, Bruun GH, Corydon TJ, Mikkelsen TS, Walker AL, Du G, Loos WJ, van Schaik RH, Baker SD, Mathijssen RH, Sparreboom A: Influence of polymorphic OATP1B-type carriers on the disposition of docetaxel. *Clin Cancer Res* 18 (16): 4433-4440, 2012

DeGorter MK, Ho RH, Leake BF, Tirona RG, Kim RB: Interaction of three regiospecific amino acid residues is required for OATP1B1 gain of OATP1B3 substrate specificity. *Mol Pharm* 9 (4): 986-995, 2012

EMA (European Medicines Agency): Guideline on the Investigation of Drug Interactions. CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2, 2012

Erlinger S, Arias IM, Dhumeaux D: Inherited disorders of bilirubin transport and conjugation: new insights into molecular mechanisms and consequences. *Gastroenterology* 146 (7): 1625-1638, 2014

Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM, Hoffmaster KA, Ishikawa T, Keppler D, Kim RB, Lee CA, Niemi M, Polli JW, Sugiyama Y, Swaan PW, Ware JA, Wright SH, Yee SW, Zamek-Gliszczynski MJ, Zhang L: Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* 9 (3): 215-236, 2010

Glaeser H, Mandery K, Sticht H, Fromm MF, Konig J: Relevance of conserved lysine and arginine residues in transmembrane helices for the transport activity of organic anion transporting polypeptide 1B3. *Br J Pharmacol* 159 (3): 698-708, 2010

Gozalpour E, Greupink R, Wortelboer HM, Bilos A, Schreurs M, Russel FG, Koenderink JB: Interaction of digitalis-like compounds with liver uptake transporters NTCP, OATP1B1, and OATP1B3. *Mol Pharm* 11 (6): 1844-1855, 2014

Gui C, Hagenbuch B: Amino acid residues in transmembrane domain 10 of organic anion transporting polypeptide 1B3 are critical for cholecystokinin octapeptide transport. *Biochemistry* 47 (35): 9090-9097, 2008

Hagenbuch B, Meier PJ: The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta* 1609 (1): 1-18, 2003

Hagenbuch B, Meier PJ: Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* 447 (5): 653-665, 2004

Hagenbuch B, Stieger B: The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters. *Mol Aspects Med* 34 (2-3): 396-412, 2013

Hamada A, Sissung T, Price DK, Danesi R, Chau CH, Sharifi N, Venzon D, Maeda K, Nagao K, Sparreboom A, Mitsuya H, Dahut WL, Figg WD: Effect of SLCO1B3 haplotype on testosterone transport and clinical outcome in caucasian patients with androgen-independent prostatic cancer. *Clin Cancer Res* 14 (11): 3312-3318, 2008

Hanggi E, Grundschober AF, Leuthold S, Meier PJ, St-Pierre MV: Functional analysis of the extracellular cysteine residues in the human organic anion transporting polypeptide, OATP2B1. *Mol Pharmacol* 70 (3): 806-817, 2006

Hartkoorn RC, Kwan WS, Shallcross V, Chaikan A, Liptrott N, Egan D, Sora ES, James CE, Gibbons S, Bray PG, Back DJ, Khoo SH, Owen A: HIV protease inhibitors are substrates for OATP1A2, OATP1B1 and OATP1B3 and lopinavir plasma concentrations are influenced by SLCO1B1 polymorphisms. *Pharmacogenet Genomics* 20 (2): 112-120, 2010

Hershko A, Ciechanover A: The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* 61 761-807, 1992

Hirano M, Maeda K, Shitara Y, Sugiyama Y: Contribution of OATP2 (OATP1B1) and OATP8 (OATP1B3) to the hepatic uptake of pitavastatin in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 311 (1): 139-146, 2004

Ho RH, Tirona RG, Leake BF, Glaeser H, Lee W, Lemke CJ, Wang Y, Kim RB: Drug and bile acid transporters in rosuvastatin hepatic uptake: function, expression, and pharmacogenetics. *Gastroenterology* 130 (6): 1793-1806, 2006

Hougaard Christensen MM, Bruun Haastrup M, Ohlenschlaeger T, Esbech P, Arnspang Pedersen S, Bach Dunvald AC, Bjerregaard Stage T, Pilsgaard Henriksen D, Thestrup Pedersen AJ: Interaction potential between clarithromycin and individual statins-A systematic review. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2019

Hu S, Franke RM, Filipinski KK, Hu C, Orwick SJ, de Bruijn EA, Burger H, Baker SD, Sparreboom A: Interaction of imatinib with human organic ion carriers. *Clin Cancer Res* 14 (10): 3141-3148, 2008

Huang F, Marzin K, Koenen R, Kammerer KP, Strelkowa N, Elgadi M, Quinson AM, Haertter S: Effect of Steady-State Faldaprevir on Pharmacokinetics of Atorvastatin or Rosuvastatin in Healthy Volunteers: A Prospective Open-Label, Fixed-Sequence Crossover Study. *J Clin Pharmacol* 57 (10): 1305-1314, 2017

Ichimaru N, Takahara S, Kokado Y, Wang JD, Hatori M, Kameoka H, Inoue T, Okuyama A: Changes in lipid metabolism and effect of simvastatin in renal transplant recipients induced by cyclosporine or tacrolimus. *Atherosclerosis* 158 (2): 417-423, 2001

Imai S, Kikuchi R, Tsuruya Y, Naoi S, Nishida S, Kusuhara H, Sugiyama Y: Epigenetic regulation of organic anion transporting polypeptide 1B3 in cancer cell lines. *Pharm Res* 30 (11): 2880-2890, 2013

Ishiguro N, Maeda K, Kishimoto W, Saito A, Harada A, Ebner T, Roth W, Igarashi T, Sugiyama Y: Predominant contribution of OATP1B3 to the hepatic uptake of telmisartan, an angiotensin II receptor antagonist, in humans. *Drug Metab Dispos* 34 (7): 1109-1115, 2006

Ismair MG, Stieger B, Cattori V, Hagenbuch B, Fried M, Meier PJ, Kullak-Ublick GA: Hepatic uptake of cholecystokinin octapeptide by organic anion-transporting polypeptides OATP4 and OATP8 of rat and human liver. *Gastroenterology* 121 (5): 1185-1190, 2001

Izumi S, Nozaki Y, Komori T, Takenaka O, Maeda K, Kusuhara H, Sugiyama Y: Investigation of Fluorescein Derivatives as Substrates of Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP) 1B1 To Develop Sensitive Fluorescence-Based OATP1B1 Inhibition Assays. *Mol Pharm* 13 (2): 438-448, 2016

Izumi S, Nozaki Y, Kusuhara H, Hotta K, Mochizuki T, Komori T, Maeda K, Sugiyama Y: Relative Activity Factor (RAF)-Based Scaling of Uptake Clearance Mediated by Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP) 1B1 and OATP1B3 in Human Hepatocytes. *Mol Pharm* 15 (6): 2277-2288, 2018

Jacquemin E, Hagenbuch B, Stieger B, Wolkoff AW, Meier PJ: Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1): 133-137, 1994

Jenkins AL, Larsen RA, Williams TB: Characterization of amino acids using Raman spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 61 (7): 1585-1594, 2005

Jung D, Hagenbuch B, Gresh L, Pontoglio M, Meier PJ, Kullak-Ublick GA: Characterization of the human OATP-C (SLC21A6) gene promoter and regulation of liver-specific OATP genes by hepatocyte nuclear factor 1 alpha. *J Biol Chem* 276 (40): 37206-37214, 2001

Jung D, Podvynec M, Meyer UA, Mangelsdorf DJ, Fried M, Meier PJ, Kullak-Ublick GA: Human organic anion transporting polypeptide 8 promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *Gastroenterology* 122 (7): 1954-1966, 2002

Kalliokoski A, Niemi M: Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol* 158 (3): 693-705, 2009

Karlgren M, Vildhede A, Norinder U, Wisniewski JR, Kimoto E, Lai Y, Haglund U, Artursson P: Classification of inhibitors of hepatic organic anion transporting polypeptides (OATPs): influence of protein expression on drug-drug interactions. *J Med Chem* 55 (10): 4740-4763, 2012

Keats BJB, Sherman SL: Population Genetics. Kirjassa: Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics, s. 1 - 12, 6. painos. Toim. Rimoin D, Pyeritz R ja Korf B, Academic Press, Oxford 2013

Kim M, Deacon P, Tirona RG, Kim RB, Pin CL, Meyer Zu Schwabedissen HE, Wang R, Schwarz UI: Characterization of OATP1B3 and OATP2B1 transporter expression in the islet of the adult human pancreas. *Histochem Cell Biol* 148 (4): 345-357, 2017

Kindla J, Muller F, Mieth M, Fromm MF, Konig J: Influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs on organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1- and OATP1B3-mediated drug transport. *Drug Metab Dispos* 39 (6): 1047-1053, 2011

Konig J, Cui Y, Nies AT, Keppler D: Localization and genomic organization of a new hepatocellular organic anion transporting polypeptide. *J Biol Chem* 275 (30): 23161-23168, 2000

Konig J, Glaeser H, Keiser M, Mandery K, Klotz U, Fromm MF: Role of organic anion-transporting polypeptides for cellular mesalazine (5-aminosalicylic acid) uptake. *Drug Metab Dispos* 39 (6): 1097-1102, 2011

Kopplow K, Letschert K, König J, Walter B, Keppler D: Human hepatobiliary transport of organic anions analyzed by quadruple-transfected cells. *Mol Pharmacol* 68 (4): 1031-1038, 2005

Kullak-Ublick GA, Hagenbuch B, Stieger B, Schteingart CD, Hofmann AF, Wolkoff AW, Meier PJ: Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. *Gastroenterology* 109 (4): 1274-1282, 1995

Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, Fattinger K, Meier PJ, Hagenbuch B: Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 120 (2): 525-533, 2001

Kunze A, Huwyler J, Camenisch G, Poller B: Prediction of organic anion-transporting polypeptide 1B1- and 1B3-mediated hepatic uptake of statins based on transporter protein expression and activity data. *Drug Metab Dispos* 42 (9): 1514-1521, 2014

Laitinen A, Niemi M: Frequencies of single-nucleotide polymorphisms of *SLCO1A2*, *SLCO1B3* and *SLCO2B1* genes in a Finnish population. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 108 (1): 9-13, 2011

Letschert K, Keppler D, König J: Mutations in the *SLCO1B3* gene affecting the substrate specificity of the hepatocellular uptake transporter OATP1B3 (OATP8). *Pharmacogenetics* 14 (7): 441-452, 2004

Leuthold S, Hagenbuch B, Mohebbi N, Wagner CA, Meier PJ, Stieger B: Mechanisms of pH-gradient driven transport mediated by organic anion polypeptide transporters. *Am J Physiol Cell Physiol* 296 (3): C570-582, 2009

Link E, Parish S, Armitage J, Bowman L, Heath S, Matsuda F, Gut I, Lathrop M, Collins R: *SLCO1B1* variants and statin-induced myopathy--a genomewide study. *N Engl J Med* 359 (8): 789-799, 2008

Liu L, Cui Y, Chung AY, Shitara Y, Sugiyama Y, Keppler D, Pang KS: Vectorial transport of enalapril by Oatp1a1/Mrp2 and OATP1B1 and OATP1B3/MRP2 in rat and human livers. *J Pharmacol Exp Ther* 318 (1): 395-402, 2006

Lupski JR: Genomic rearrangements and sporadic disease. *Nat Genet* 39 (7 Suppl): S43-47, 2007

Mahagita C, Grassl SM, Piyachaturawat P, Ballatori N: Human organic anion transporter 1B1 and 1B3 function as bidirectional carriers and do not mediate GSH-bile acid cotransport. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 293 (1): G271-G278, 2007

McFeely SJ, Wu L, Ritchie TK, Unadkat J: Organic anion transporting polypeptide 2B1 - More than a glass-full of drug interactions. *Pharmacol Ther* 196 204-215, 2019

Mescher AL: Junqueira's Basic Histology:Text & Atlas. 15. painos. McGraw-Hill Education, New York 2018

Mochly-Rosen D, Das K, Grimes KV: Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nat Rev Drug Discov* 11 (12): 937-957, 2012

Murray M, Zhou F: Trafficking and other regulatory mechanisms for organic anion transporting polypeptides and organic anion transporters that modulate cellular drug and xenobiotic influx and that are dysregulated in disease. *Br J Pharmacol* 174 (13): 1908-1924, 2017

Nakagomi-Hagihara R, Nakai D, Kawai K, Yoshigae Y, Tokui T, Abe T, Ikeda T: OATP1B1, OATP1B3, and mrp2 are involved in hepatobiliary transport of olmesartan, a novel angiotensin II blocker. *Drug Metab Dispos* 34 (5): 862-869, 2006

Noe J, Portmann R, Brun ME, Funk C: Substrate-dependent drug-drug interactions between gemfibrozil, fluvastatin and other organic anion-transporting peptide (OATP) substrates on OATP1B1, OATP2B1, and OATP1B3. *Drug Metab Dispos* 35 (8): 1308-1314, 2007

Nozawa T, Minami H, Sugiura S, Tsuji A, Tamai I: Role of organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C) in hepatic uptake of irinotecan and its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin: in vitro evidence and effect of single nucleotide polymorphisms. *Drug Metab Dispos* 33 (3): 434-439, 2005

Omasits U, Ahrens CH, Muller S, Wollscheid B: Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics* 30 (6): 884-886, 2014

Pasanen MK, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Niemi M: SLCO1B1 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of simvastatin acid. *Pharmacogenet Genomics* 16 (12): 873-879, 2006

Picard N, Yee SW, Woillard JB, Lebranchu Y, Le Meur Y, Giacomini KM, Marquet P: The role of organic anion-transporting polypeptides and their common genetic variants in mycophenolic acid pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 87 (1): 100-108, 2010

Powell J, Farasyn T, Kock K, Meng X, Pahwa S, Brouwer KL, Yue W: Novel mechanism of impaired function of organic anion-transporting polypeptide 1B3 in human hepatocytes: post-translational regulation of OATP1B3 by protein kinase C activation. *Drug Metab Dispos* 42 (11): 1964-1970, 2014

Prueksaritanont T, Chu X, Evers R, Klopfer SO, Caro L, Kothare PA, Dempsey C, Rasmussen S, Houle R, Chan G, Cai X, Valesky R, Fraser IP, Stoch SA: Pitavastatin is a more sensitive and selective organic anion-transporting polypeptide 1B clinical probe than rosuvastatin. *Br J Clin Pharmacol* 78 (3): 587-598, 2014

Rowland M, Tozer TN: *Nonlinearities, Drug Interactions*. Kirjassa: *Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: Concepts and Applications*, s. 445-525, 4. painos. Toim. Troy D, Wolters Kluwer Health/Lippincott William & Wilkins, Philadelphia 2011

Roy-Chowdhury J, Roy-Chowdhury N: *Bilirubin Metabolism and its Disorders* Kirjassa: *Zakim and Boyer's Hepatology A Textbook of Liver Disease*, s. 1079-1109, 6. painos. Toim. Thomas B, Michael M ja Arun S, Elsevier Inc., Philadelphia 2012

Sane RS, Steinmann GG, Huang Q, Li Y, Podila L, Mease K, Olson S, Taub ME, Stern JO, Nehmiz G, Bocher WO, Asselah T, Tweedie D: Mechanisms underlying benign and reversible unconjugated hyperbilirubinemia observed with faldaprevir administration in hepatitis C virus patients. *J Pharmacol Exp Ther* 351 (2): 403-412, 2014

Sanna S, Busonero F, Maschio A, McArdle PF, Usala G, Dei M, Lai S, Mulas A, Piras MG, Perseu L, Masala M, Marongiu M, Crisponi L, Naitza S, Galanello R, Abecasis GR, Shuldiner AR, Schlessinger D, Cao A, Uda M: Common variants in the SLCO1B3 locus are associated with bilirubin levels and unconjugated hyperbilirubinemia. *Hum Mol Genet* 18 (14): 2711-2718, 2009

Santos M, Niemi M, Hiratsuka M, Kumondai M, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM, Rodriguez-Antona C: Novel copy-number variations in pharmacogenes contribute to interindividual differences in drug pharmacokinetics. *Genet Med* 20 (6): 622-629, 2018

Satlin LM, Amin V, Wolkoff AW: Organic anion transporting polypeptide mediates organic anion/HCO₃⁻ exchange. *J Biol Chem* 272 (42): 26340-26345, 1997

Schwarz UI, Meyer zu Schwabedissen HE, Tirona RG, Suzuki A, Leake BF, Mokrab Y, Mizuguchi K, Ho RH, Kim RB: Identification of novel functional organic anion-transporting polypeptide 1B3 polymorphisms and assessment of substrate specificity. *Pharmacogenet Genomics* 21 (3): 103-114, 2011

Seithel A, Eberl S, Singer K, Auge D, Heinkele G, Wolf NB, Dorje F, Fromm MF, König J: The influence of macrolide antibiotics on the uptake of organic anions and drugs mediated by OATP1B1 and OATP1B3. *Drug Metab Dispos* 35 (5): 779-786, 2007

Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K: dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 29 (1): 308-311, 2001

Shitara Y: Clinical importance of OATP1B1 and OATP1B3 in drug-drug interactions. *Drug Metab Pharmacokinet* 26 (3): 220-227, 2011

Shitara Y, Takeuchi K, Nagamatsu Y, Wada S, Sugiyama Y, Horie T: Long-lasting inhibitory effects of cyclosporin A, but not tacrolimus, on OATP1B1- and OATP1B3-mediated uptake. *Drug Metab Pharmacokinet* 27 (4): 368-378, 2012

Simonson SG, Raza A, Martin PD, Mitchell PD, Jarcho JA, Brown CD, Windass AS, Schneck DW: Rosuvastatin pharmacokinetics in heart transplant recipients administered an antirejection regimen including cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 76 (2): 167-177, 2004

Smith NF, Acharya MR, Desai N, Figg WD, Sparreboom A: Identification of OATP1B3 as a high-affinity hepatocellular transporter of paclitaxel. *Cancer Biol Ther* 4 (8): 815-818, 2005

Smith NF, Marsh S, Scott-Horton TJ, Hamada A, Mielke S, Mross K, Figg WD, Verweij J, McLeod HL, Sparreboom A: Variants in the SLCO1B3 gene: interethnic distribution and association with paclitaxel pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 81 (1): 76-82, 2007

Suga T, Yamaguchi H, Sato T, Maekawa M, Goto J, Mano N: Preference of Conjugated Bile Acids over Unconjugated Bile Acids as Substrates for OATP1B1 and OATP1B3. *PLoS One* 12 (1): e0169719, 2017

Svoboda M, Wlcek K, Taferner B, Hering S, Stieger B, Tong D, Zeillinger R, Thalhammer T, Jäger W: Expression of organic anion-transporting polypeptides 1B1 and 1B3 in ovarian cancer cells: relevance for paclitaxel transport. *Biomed Pharmacother* 65 (6): 417-426, 2011

Thakkar N, Kim K, Jang ER, Han S, Kim K, Kim D, Merchant N, Lockhart AC, Lee W: A cancer-specific variant of the SLCO1B3 gene encodes a novel human organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) localized mainly in the cytoplasm of colon and pancreatic cancer cells. *Mol Pharm* 10 (1): 406-416, 2013

Treiber A, Schneider R, Hausler S, Stieger B: Bosentan is a substrate of human OATP1B1 and OATP1B3: inhibition of hepatic uptake as the common mechanism of its interactions with cyclosporin A, rifampicin, and sildenafil. *Drug Metab Dispos* 35 (8): 1400-1407, 2007

Tsujimoto M, Hirata S, Dan Y, Ohtani H, Sawada Y: Polymorphisms and linkage disequilibrium of the OATP8 (OATP1B3) gene in Japanese subjects. *Drug Metab Pharmacokinet* 21 (2): 165-169, 2006

van de Steeg E, Stranecky V, Hartmannova H, Noskova L, Hrebicek M, Wagenaar E, van Esch A, de Waart DR, Oude Elferink RP, Kenworthy KE, Sticova E, al-Edreesi M, Knisely AS, Kmoch S, Jirsa M, Schinkel AH: Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver. *J Clin Invest* 122 (2): 519-528, 2012

van de Steeg E, Wagenaar E, van der Kruijsen CM, Burggraaff JE, de Waart DR, Elferink RP, Kenworthy KE, Schinkel AH: Organic anion transporting polypeptide 1a/1b-knockout mice provide insights into hepatic handling of bilirubin, bile acids, and drugs. *J Clin Invest* 120 (8): 2942-2952, 2010

van de Steeg E, van Esch A, Wagenaar E, Kenworthy KE, Schinkel AH: Influence of human OATP1B1, OATP1B3, and OATP1A2 on the pharmacokinetics of methotrexate and paclitaxel in humanized transgenic mice. *Clin Cancer Res* 19 (4): 821-832, 2013

Vavricka SR, Jung D, Fried M, Grutzner U, Meier PJ, Kullak-Ublick GA: The human organic anion transporting polypeptide 8 (SLCO1B3) gene is transcriptionally repressed by hepatocyte nuclear factor 3beta in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 40 (2): 212-218, 2004

Vavricka SR, Van Montfoort J, Ha HR, Meier PJ, Fattinger K: Interactions of rifamycin SV and rifampicin with organic anion uptake systems of human liver. *Hepatology* 36 (1): 164-172, 2002

Wickramasekara S, Singhal A, Li C: Benchling. CA, Yhdysvallat, 2012 (12. tammikuuta 2020). Saatavilla Internetistä: <https://benchling.com>

Wood M, Ananthanarayanan M, Jones B, Wooton-Kee R, Hoffman T, Suchy FJ, Vore M: Hormonal regulation of hepatic organic anion transporting polypeptides. *Mol Pharmacol* 68 (1): 218-225, 2005

Yamaguchi H, Kobayashi M, Okada M, Takeuchi T, Unno M, Abe T, Goto J, Hishinuma T, Mano N: Rapid screening of antineoplastic candidates for the human organic anion transporter OATP1B3 substrates using fluorescent probes. *Cancer Lett* 260 (1-2): 163-169, 2008

Yamashiro W, Maeda K, Hirouchi M, Adachi Y, Hu Z, Sugiyama Y: Involvement of transporters in the hepatic uptake and biliary excretion of valsartan, a selective antagonist of the angiotensin II AT1-receptor, in humans. *Drug Metab Dispos* 34 (7): 1247-1254, 2006

Yao J, Hong W, Huang J, Zhan K, Huang H, Hong M: N-Glycosylation dictates proper processing of organic anion transporting polypeptide 1B1. *PLoS One* 7 (12): e52563, 2012

Yee SW, Brackman DJ, Ennis EA, Sugiyama Y, Kamdem LK, Blanchard R, Galetin A, Zhang L, Giacomini KM: Influence of Transporter Polymorphisms on Drug Disposition and Response: A Perspective From the International Transporter Consortium. *Clin Pharmacol Ther* 104 (5): 803-817, 2018

Zhou F, Zhu L, Wang K, Murray M: Recent advance in the pharmacogenomics of human Solute Carrier Transporters (SLCs) in drug disposition. *Adv Drug Deliv Rev* 116 21-36, 2017

Zimmerman EI, Hu S, Roberts JL, Gibson AA, Orwick SJ, Li L, Sparreboom A, Baker SD: Contribution of OATP1B1 and OATP1B3 to the disposition of sorafenib and sorafenib-glucuronide. *Clin Cancer Res* 19 (6): 1458-1466, 2013

Zurth C, Koskinen M, Fricke R, Prien O, Korjamo T, Graudenz K, Denner K, Bairlein M, von Buhler CJ, Wilkinson G, Gieschen H: Drug-Drug Interaction Potential of Darolutamide: In Vitro and Clinical Studies. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 44 (6): 747-759, 2019

LIITTEET

LIITE 1. WTP-variantin arvioitu aminohapposekvenssi. Punaisella merkityt aminohapot tarkoittavat 15 ylimääräistä aminohappoa.

WTP-variantin aminohapposekvenssi

MDQHQLNKTA ESASSEKKKTRRCNGFKMFLAALSFSYIAKALGGIIMKI
SITQIERRFDISSLAGLIDGSFEIGNLLVIVFVS YFGSKLHRPKLIGIGCLLMGT
GSILTSLPHFFMGYYRYSKETHINPSENSTSSLSTCLINQTL SFNGTSPEIVEKD
CVKESGSHMWIYVFMGNMLRGIGETPIVPLGISYIDDFAKEGHSSLYLGSLN
AIGMIGPVIGFALGSLFAKMYVDIGYVDLSTIRITPKDSRWVGAWWLGLVVS
GLFSIISSIPFFFLPKNPKNKPQKERKISLSLHVLKTNDDRNQTANLTNQGKNVT
KNVTGFFQSLKSILTNPLYVIFLLL TLLQVSSFIGSFTYVFKYMEQQY GQSASH
ANFLLGIITPTVATGMFLGGFIIKKFKLSLVGIAKFSFLTSMISFLFQLLYFPLI
CESKSVAGLTLTYDGNNSVASHVDVPLSYCNSECNCDESQWEPVCGNNGIT
YLSPLAGCKSSSGIKKHTVFYNCSCVEVTGLQNRNYS AHLGECPRDNTCTR
KFFIYVAIQVINSLSFATGGTTFILLTVKIVQPELKALAMGFQSMVIRTLGGIL
APIYFGALIDKTCMKWSTNSCGAQGACRIYNSVFFGRVYLGLSIALRFPALVL
YIVFIFAMKKKFQ GKDTKASDNERKVMDEANLEFLNNGEHFVPSAGTDSKT
CNLDMQDNAAAN **SGLMGPAFLYKV VDR**